

Martin Bernhard Anton Graßl

---

## Methodische Untersuchung zur exfoliativen Endometriumszytologie bei der Stute



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie  
und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. A. Wehrend

# **Methodische Untersuchung zur exfoliativen Endometriumszytologie bei der Stute**

## **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Martin Bernhard Anton Graßl**

Tierarzt aus Landshut (Bayern)

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. Axel Wehrend

2. Gutachter: Prof. Dr. Kerstin Fey

Tag der Disputation: 06.10.2014

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Bochum, den 18.02.2014

Martin Bernhard Anton Graßl

*In Erinnerung an meine verstorbenen  
Großeltern  
Dr. med. vet. Anton Graßl und Antonie Graßl*

## **Inhalt**

<b>1 Einleitung und Fragestellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literatur.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Zyklische Veränderungen am Endometrium der Stute .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Außerhalb des Puerperiums .....	2
2.1.2 Innerhalb des Puerperiums.....	4
<b>2.2 Prinzip der exfoliativen Endometriumszytologie .....</b>	<b>7</b>
2.2.1 Indikation .....	7
2.2.2 Entnahmetechnik .....	13
2.2.3 Entnahmezeitpunkt .....	18
2.2.4 Probenaufbereitung .....	18
<b>2.3 Interpretation der exfoliativen Endometriumszytologie .....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Mikroskopische Untersuchung .....	21
2.3.2 Endometriumzellen.....	22
2.3.3 Erythrozyten.....	26
2.3.4 Neutrophile Granulozyten.....	26
2.3.5 Sonstige Zelltypen .....	31
2.3.6 Bakterien, Pilze und Kristalle .....	32
<b>3 Material und Methode .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1 Probanden .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2 Versuche .....</b>	<b>33</b>
3.2.1 Vergleich zweier Zytologie-Entnahmesysteme.....	33
3.2.2 Einfluss der hormonellen Situation auf das Auftreten von Endometriumzellen und Erythrozyten im Ausstrich .....	34
<b>3.3 Untersuchungsverfahren .....</b>	<b>34</b>
3.3.1 Gynäkologische Untersuchung .....	34
3.3.2 Trächtigkeitsuntersuchung .....	37
3.3.3 Entnahmetechnik der zytologischen Untersuchung.....	37
3.3.4 Besamungstechnik .....	39
3.3.5 Entnahmetechnik der Blutserumprobe.....	39
<b>3.4 Probenaufbereitung.....</b>	<b>39</b>
3.4.1 Probenaufbereitung für die zytologische Untersuchung.....	39

3. 4. 2	Probenaufbereitung für die Bestimmung des hormonellen Status.....	40
<b>3. 5</b>	<b>Auswertung .....</b>	<b>40</b>
3. 5. 1	Lichtmikroskopische Auswertung der exfoliativen Endometriumszytologien.....	40
3. 5. 2	Auswertung der Blutserumproben .....	41
<b>3. 6</b>	<b>Statistische Methoden .....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
<b>4. 1</b>	<b>Angaben zum Stutenkollektiv und der gynäkologischen Untersuchung.....</b>	<b>44</b>
<b>4. 2</b>	<b>Ergebnisse der exfoliativen Endometriumszytologie .....</b>	<b>45</b>
4. 2. 1	Zelldifferenzierung .....	45
4. 2. 1	Zytologische Parameter .....	48
<b>4. 3</b>	<b>Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung.....</b>	<b>48</b>
<b>4. 4</b>	<b>Ergebnis des hormonellen Status.....</b>	<b>49</b>
<b>4. 5</b>	<b>Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der exfoliativen Endometriumszytologie und dem Entnahmesystem .....</b>	<b>50</b>
<b>4. 6</b>	<b>Einflussfaktoren auf das Ergebnis der exfoliativen Endometriumszytologie.....</b>	<b>53</b>
4. 6. 1	Einfluss des hormonellen Status auf die Zellzahl .....	53
4. 6. 2	Einfluss anamnestischer Daten, des Uterusödems und des Abstandes zwischen Probenentnahme und Geburt bzw. der Ovulation auf die Zellzahl .....	60
<b>4. 7</b>	<b>Einflussfaktoren auf die Etablierung einer Trächtigkeit.....</b>	<b>64</b>
4. 7. 1	Ergebnis der exfoliativen Endometriumszytologie.....	64
4. 7. 1. 1	Einfluss der Zusammensetzung der exfoliativen Endometriumszytologie bei der Stute auf die Etablierung einer Trächtigkeit bezogen auf die erste Besamung innerhalb der Decksaison.....	64
4. 7. 1. 2	Einfluss der Zusammensetzung der exfoliativen Endometriumszytologie bei der Stute auf die Etablierung einer Trächtigkeit unabhängig von der Besamungshäufigkeit.....	65
4. 7. 2	Anamnese.....	66
4. 7. 3	Gynäkologische Untersuchung .....	66
4. 7. 4	Konserviertes Sperma .....	67
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
<b>5. 1</b>	<b>Diskussion der Fragestellung .....</b>	<b>68</b>



<b>5. 2 Diskussion der Methodik .....</b>	<b>69</b>
5. 2. 1 Stuten .....	69
5. 2. 2 Intrauterine Probenentnahme .....	69
5. 2. 3 Zytologische Untersuchung .....	70
<b>5. 3 Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>71</b>
5. 3. 1 Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der exfoliativen Endometriumszytologie und dem Entnahmesystem .....	71
5. 3. 2 Zusammenhang zwischen dem hormonellen Status und dem Ergebnis der exfoliativen Endometriumszytologie .....	72
5. 3. 3 Zusammenhang zwischen Zellzahl, der Anamnese, dem Uterusödem und dem Abstand zwischen Probenentnahme und Geburt bzw. Ovulation .....	74
5. 3. 4 Einflussfaktoren auf die Etablierung einer Trächtigkeit .....	75
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>79</b>
<b>7 Summary .....</b>	<b>81</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>83</b>



## **1 Einleitung und Fragestellung**

Die exfoliative Endometriumszytologie ist ein Verfahren, das Bestandteil der gynäkologischen Untersuchung der Stute ist. Zur Beurteilung der entnommenen Proben wird in erster Linie die Anwesenheit bzw. Abwesenheit neutrophiler Granulozyten herangezogen. Über die Bedeutung der Anzahl der Endometriumzellen und der Anwesenheit von Erythrozyten im Ausstrich liegen bisher keine Daten vor.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es folgende Fragen zu beantworten:

- Unterscheiden sich zwei Entnahmesysteme hinsichtlich der Häufigkeit des Nachweises von Erythrozyten im Ausstrich?
- Hat der Nachweis von Erythrozyten im Ausstrich Einfluss auf die Etablierung einer Trächtigkeit?
- Hat die Anzahl von Endometriumzellen im Ausstrich einen Einfluss auf die Etablierung einer Trächtigkeit?
- Welche Faktoren beeinflussen das Auftreten von Endometriumzellen und Erythrozyten im Ausstrich?

## 2 Literatur

### 2.1 Zyklische Veränderungen am Endometrium der Stute

#### 2.1.1 Außerhalb des Puerperiums

Der Uterus der Stute besteht aus drei Schichten. Die äußere Schicht wird durch das Perimetrium und die mittlere durch das Myometrium gebildet. Das Myometrium setzt sich von außen nach innen aus einer longitudinalen und einer zirkulären Muskelschicht zusammen. Das Endometrium stellt die innere Schicht des Uterus dar (Kenney, 1978).

Die Gebärmutter Schleimhaut ist lumenwärts mit einem einschichtigen Epithel ausgekleidet und grenzt mit ihrer Lamina propria direkt an den zirkulären Bestandteil des Myometriums. Das lumenale einschichtige Epithel des Endometriums besteht aus iso- bis hochprismatischen Zellen (Kenney, 1978), von denen in etwa die Hälfte Zilien aufweist (Kenney, 1978; Tunón et al., 1995; Bae und Watson, 2003). Zellen ohne Zilienbesatz haben eine sekretorische Funktion (Tillmann und Meinecke, 1980). Die Lamina propria besteht aus dem Stratum compactum, das sich unter der Basalmembran des Endometriumepithels befindet, und dem Stratum spongiosum. Das Stratum compactum ist zwischen 0,75 und einem Millimeter hoch, weist eine relativ hohe Dichte an Stromazellen auf und beinhaltet eine Vielzahl von Kapillaren unter der Basalmembran des Epithels. Das Stratum spongiosum hat eine niedrigere Zelldichte und beinhaltet Arteriolen, Venolen, Kapillaren und Lymphgefäße. Fibrozyten sind der charakteristische Zelltyp in dieser Schicht (Kenney, 1978).

Der wichtigste Bestandteil der Lamina propria sind die zahlreichen Uterindrüsen, welche dem Uterusepithel entspringen und mit diesem verbunden sind. Der Ausführungsgang liegt im Bereich des Stratum compactum und mündet in das uterine Lumen. Der mittlere und basale Drüsenteil ist Bestandteil des Stratum spongiosum und besteht aus vielen verzweigten tubulären Anteilen (Kenney, 1978).

Die Oberfläche des Endometriums bildet zwölf bis 15 Falten, die longitudinal angeordnet sind. Im Querschnitt verursacht diese Anordnung radiale Hohlräume zwischen den Falten, die von beiden Seiten mit sekretorisch aktiven endometrialen Oberflächen in Kontakt stehen (Kenney, 1978).

Die zyklischen Veränderungen am Endometrium der Stute lassen sich in den Proöstrus (Kenney, 1978; Schoon et al., 1992), den Östrus (Tunón et al., 1995; Samper, 2010), den Diöstrus (Samuel et al., 1979; Keenan et al., 1991) und den Anöstrus (Kenney, 1978) unterteilen.

Während des Proöstrus bilden die Epithelzellen des Endometriums ein einschichtiges bzw.

mehrröhiges hochprismatisches Epithel. Die verzweigten Uterindrüsen können in Nestern angeordnet sein. Die Organisation in Nestern wird durch das beginnende Ödem des Stromas verursacht und darf nicht mit der pathologischen Form der Nesterbildung verwechselt werden, die durch eine periglanduläre Fibrosierung verursacht werden kann (Kenney, 1978; Schoon et al., 1992). In Form einer Streckung der Drüsen, einer beginnenden Erhöhung der Mukosa und des Oberflächenepithels erfolgt im Verlauf dieser Zyklusphase eine Proliferation der Endometriums, die mit einer erhöhten Mitoserate in den oberflächlichen und luminalen glandulären Epithelien und Stromazellen verbunden ist (Schoon et al., 1992).

Im Östrus liegen hohe Östrogen- und niedrige Progesteronwerte vor, was eine Ödematisierung der Lamina propria des Uterus verursacht (Tunón et al., 1995). Das endometriale Ödem hat in der ultrasonographischen Untersuchung ein typisches Erscheinungsbild, das oft als 'Radspeichenphänomen' beschrieben wird und sein Maximum ein bis zwei Tage vor der Ovulation erreicht (Samper, 2010; McCue et al., 2011). Im Zuge des beginnenden Östrus erreicht das luminale Epithel seine maximale Höhe von bis zu 50 µm, welche im Verlauf der Rosse wieder abnimmt. Zusätzlich weisen die Epithelzellen supranukleare Sekretionsvesikel auf, die auf eine sekretorische Aktivität schließen lassen (Tunón et al., 1995), sowie eine erhöhte Dichte von Ribosomen und rauem endoplasmatischem Retikulum auf (Keenan et al., 1991). Der Großteil der Epithelzellen ist von polygonaler Form und mit Mikrovilli an der apikalen Membran ausgestattet. Die Anzahl der sekretorischen Zellen (ohne Zilien) erreicht ihr Maximum gegen Mitte der Rosse. Sie sind um die Öffnungen der Uterindrüsen angeordnet (Samuel et al., 1979; Keenan et al., 1991) und können in mehrreihiger Form vorliegen (Schoon et al., 1992). Die sekretorischen Zellen des equinen Uterus können Oxytozin produzieren und speichern (Bae und Watson, 2003). Die sekretorische Aktivität des Endometriums und eine erhöhte Aktivität des Myometriums tragen zur uterinen Clearance bei, um Infektionen zu vermeiden (Aurich, 2011). Daneben besteht während des Östrus eine Tendenz neutrophiler Granulozyten, sich in den Venolen anzusammeln und durch das Stroma bis in das uterine Lumen zu migrieren (Kenney, 1978). Als Folge des endometrialen Ödems ist die Dichte der uterinen Drüsen herabgesetzt (Kenney, 1978; Lefranc und Allen, 2007) und sie weisen ein kubisches (Tunón et al., 1995) bis hochprismatisches Epithel auf (Lefranc und Allen, 2007).

Der Diöstrus ist der Zyklusabschnitt zwischen zwei Rosseperioden (Löfstedt, 2011) und ist hormonell durch hohe Progesteron- und niedrige Östrogenwerte charakterisiert (Davies Morel, 2008; Löfstedt, 2011). Zu Beginn dieses Zyklusabschnittes kann die Höhe des luminalen Epithels von abgeflacht über iso- bis hochprismatisch variieren. Hypertrophe Golgi-Apparate, eine Vielzahl von sekretorischen Vesikeln und ein prominentes raues endoplasmatisches Retikulum zeugen von einer erhöhten Proteinsynthese (Keenan et al., 1991). Ab dem siebten Tag ist das Epithel abgeflacht

und nimmt am Ende des Diöstrus wieder eine kubische Form an (Kenney, 1978). Hinzu kommt, dass in diesem Teil des Zyklus die Anzahl der sekretorischen Zellen stark abnimmt (Samuel et al., 1979). Die Dichte und die Anzahl der Zellen, die Zilien an ihrer apikalen Membran aufweisen, erreichen ihr Maximum in der Mitte des Diöstrus und nehmen daraufhin wieder ab (Samuel et al., 1979; Keenan et al., 1991). Auf Grund einer Längenzunahme der uterinen Drüsen, in Form von Windungen, und eines verminderten Ödems nimmt die Dichte der uterinen Drüsen zu (Kenney, 1978; Lefranc und Allen, 2007). Während des Diöstrus hat der Uterus in der ultrasonographischen Untersuchung eine homogene Echotextur (Samper, 2010).

Schoon et al. (1992) unterteilen den Interöstrus in eine Sekretions- und eine Involutionsphase, wobei der erstgenannte Abschnitt von der bereits beschriebenen erhöhten sekretorischen Aktivität und der zweite Abschnitt von einem flachen Oberflächenepithel, einer flachen Mukosa und aufgeknäulten Drüsen charakterisiert sind.

Auf Grund fehlender follikulärer oder lutealer Aktivität im Anöstrus tritt in der Gebärmutter Schleimhaut ein gewisser Grad an Atrophie auf. Dies kann bereits eintreten, bevor ein Anzeichen des Anöstrus im Verhalten oder am Ovar sichtbar sind. Hierbei weist das Endometriumseithel eine kubische Form auf, das Zytoplasma stellt sich basophil dar und ein Ödem des Stroma ist nicht vorhanden. Die uterinen Drüsen sind nicht gewunden und haben ein kubisches Epithel. Außerdem kann der Ausführungsgang der Drüsen mit einem amorphen Material verschlossen sein (Kenney, 1978).

## 2. 1. 2 Innerhalb des Puerperiums

Das Puerperium umfasst die Zeitspanne vom Ende der Geburt bis zum vollständigen Abschluss der Rückbildung und Regeneration des Uterus (Aurich, 2009).

Die Plazentation des Pferdes ermöglicht ein sehr kurzes Puerperium, sodass bereits nach zwei Wochen wieder die Etablierung einer Trächtigkeit möglich ist (Stanton, 2011).

Bei der Plazentation des Pferdes sind Mikrokotyledonen über das gesamte Chorion verteilt und bilden zusammen mit den Mikrokarunkeln eine Semiplacenta diffusa completa, die einen ausreichend engen, aber nicht zu festen Kontakt bilden. Sie erzeugen durch ihre fingerförmige Struktur und vielen Verzweigungen sogenannte Zottenbüschel, die zusammen mit den maternalen Krypten eine Placenta epithelochorealis bilden (Schnorr und Kressin, 2001).

Während eines normalen Geburtsverlaufes lösen sich innerhalb von 60 Minuten alle fetalen Bestandteile der Plazenta aus den maternalen Mikrokarunkeln (Steven et al., 1979).

Puerperale Veränderungen des Endometriums lassen sich durch zytologische Untersuchungen des Lochialsekretes (Belz und Glatzel, 1995) und histologische Untersuchungen der Gebärmutter-

schleimhaut (Gygax et al., 1979; Steven et al., 1979; Bailey und Bristol, 1983; Katila, 1988; Katila et al., 1988; Belz und Glatzel, 1995; Gomez-Cuetara et al., 1995) darstellen.

Bereits Katila (1988) und Belz et al. (1995) konnten zeigen, dass innerhalb der ersten 24 Stunden p. p. ein weit ausgedehnter Uterusepithelverlust vorliegen kann. Falls das Epithel jedoch vorhanden ist, sind die Zellen über den Mikrokarunkeln flacher als zwischen den Endometriumskrypten (Katila, 1988). Besonders ab dem sechsten Tag p. p. ist eine erhöhte mitotische Aktivität (Belz und Glatzel, 1995) und eine damit verbundene Regeneration des Uterusepithels zu beobachten. Als Folge von Nachgeburtsverhaltungen oder Schweregeburten ist eine starke Infiltration des Uterusepithels mit neutrophilen Granulozyten zu beobachten (Belz und Glatzel, 1995).

Direkt nach der Geburt ist das Endometrium nahezu komplett mit Mikrokarunkeln bedeckt. Diese sind mit einem einschichtigen zylindrischen Epithel ausgekleidet (Gomez-Cuetara et al., 1995), tief und gut sichtbar (Gygax et al., 1979; Bailey und Bristol, 1983; Katila, 1988). Zum Großteil sind die Krypten leer, vereinzelt kann Zelldebris der Mikrokotyledonen gefunden werden (Gygax et al., 1979; Belz und Glatzel, 1995; Gomez-Cuetara et al., 1995). Degenerative Prozesse verursachen einen raschen Abbau der Mikrokarunkeln. Bereits nach zwei bis sechs Stunden (Katila, 1988) sind erste Veränderungen sichtbar, welche nach 24 Stunden in Form von Vakuolisierung des Kryptenepithels, Zelldetritus, Karyorrhexis, Karyolyse und einer Lumenabnahme deutlich zu sehen sind (Bailey und Bristol, 1983; Katila, 1988; Belz und Glatzel, 1995). Diese Vorgänge verlaufen progressiv, ab dem fünften Tag p. p. werden die Mikrokotyledonen durch eosinophile Massen, Siderophagen (Gomez-Cuetara et al., 1995), Makrophagen und Lymphozyten ersetzt (Bailey und Bristol, 1983; Katila, 1988) und das Lumen der Krypten ist nicht mehr sichtbar (Bailey und Bristol, 1983). Die Reste der Endometriumkrypten sind ab dem neunten und zehnten Tag p. p. praktisch nicht mehr vorhanden (Bailey und Bristol, 1983; Katila, 1988; Belz und Glatzel, 1995) und stattdessen lassen sich nur noch vereinzelt Lymphozyten und Siderophagen finden (Katila, 1988). In einer Studie von Gygax et al. (1979) konnte jedoch gezeigt werden, dass die Mikrokarunkel bereits ab dem sechsten oder siebten Tag p. p. verschwunden waren oder nur noch vereinzelt Reste in Form von lokal verdichtetem Stroma oder vakuolisierten Kryptenepithelzellen sichtbar sind.

Bei Stuten, die eine Retentio secundinarum aufweisen, verläuft der Abbau der Mikrokarunkel schneller und ist mit dem sechsten Tag p. p. abgeschlossen (Belz und Glatzel, 1995).

Die zahlreich im Stratum spongiosum vorkommenden Uterindrüsen sind innerhalb der ersten beiden Tage p. p. stark dilatiert und das Lumen enthält massenhaft eosinophilen Zelldetritus (Bailey und Bristol, 1983; Katila, 1988; Belz und Glatzel, 1995). Am dritten Tag p. p. konnten Belz et al. (1995) in einer Studie mit 55 Stuten bei 56,4 % der Tiere neutrophile Granulozyten im Lumen der

Uterindrüsen nachweisen. Ab dem vierten Tag nach der Geburt sind die Drüsenzellen nicht mehr dilatiert und der Zelldetritus ist verschwunden (Bailey und Bristol, 1983). Sechs Tage nach der Geburt lässt sich im Zuge der Zellregeneration des Drüsenepithels eine deutliche Zunahme der Mitose-rate in Form von Mitosefiguren beobachten. Die Regeneration erfolgt umso schneller, je näher die Uterindrüsen am Endometriumlumen liegen und ist nach zehn Tagen abgeschlossen (Bailey und Bristol, 1983; Katila, 1988; Belz und Glatzel, 1995).

Zusätzlich zu den Veränderungen der Mikrokarunkel und Uterindrüsen findet eine entzündliche Veränderung im Stratum compactum und spongiosum statt.

Segmentkernige neutrophile Granulozyten lassen sich ab dem zweiten Tag p. p. im Stratum compactum nachweisen, werden jedoch ab dem dritten Tag p. p. kontinuierlich durch Lymphozyten und Makrophagen ersetzt (Bailey und Bristol, 1983; Katila, 1988; Belz und Glatzel, 1995). Eine „mäßig starke“ Infiltration des Endometriums mit neutrophilen Granulozyten ist als physiologisch anzusehen (Belz und Glatzel, 1995). Der Grad der Infiltration mit neutrophilen Granulozyten im Stratum compactum ist jedoch von verschiedenen Faktoren abhängig. Da der Uterus im Puerperium mit einer Vielzahl von Bakterien besiedelt wird (Gygax et al., 1979; Bailey und Bristol, 1983), sind Bailey und Bristol (1983) zu dem Schluss gekommen, dass der Grad der Infiltration davon abhängig ist, welcher Bakterientyp der dominante Keim ist. So konnten sie zeigen, dass bei Stuten mit einem positiven Befund von *Streptococcus* spp., eine stärkere entzündliche Reaktion erfolgt als bei Stuten mit einem anderen Keimnachweis.

Neben der infektiösen Ursache spielt auch der Zeitpunkt des Nachgeburtabganges eine wesentliche Rolle. Nach einem verzögerten Nachgeburtsabgang befinden sich im Stratum compactum vermehrt neutrophile Granulozyten (Steven et al., 1979) und bilden einen subepithelialen „Demarkations-wall“ (Belz und Glatzel, 1995). Nach manueller Abnahme der Nachgeburt konnte ebenfalls eine große Anzahl segmentkerniger neutrophiler Granulozyten sowohl im Lumen der Krypten, als auch zwischen den Epithelzellen beobachtet werden (Steven et al., 1979).

Dagegen lassen sich im Stratum spongiosum in Arealen mit vermehrtem Zelldetritus oder diffus verteilt ab dem sechsten Tag p. p. Makrophagen und Lymphozyten in großer Anzahl nachweisen (Bailey und Bristol, 1983; Belz und Glatzel, 1995). Siderophagen, eine Sonderform der Makrophagen, können vermehrt im Epithel der Uterindrüsen gefunden werden und dort persistieren (Katila, 1988; Belz und Glatzel, 1995). Im weiteren puerperalen Verlauf nimmt die Zahl der Makrophagen und Lymphozyten ab, jedoch bleiben sie bis in die Fohlenrosse vorhanden (Belz und Glatzel, 1995). Die histologischen Veränderungen des Endometriums sind ab dem 14. Tag p. p. verschwunden, abgesehen von vereinzelt auftretenden leichten Pleomorphismen des luminalen Epithels, sporadisch entzündlichen Veränderungen und kleinen Ansammlungen von Siderophagen (Gygax et al., 1979).



Neutrophile Granulozyten sind im frühen Stadium des Puerperiums Teil des physiologischen Lochialsekretes der Stute. Die Menge der neutrophilen Granulozyten nimmt im Verlauf des Puerperiums vom dritten über den sechsten bis hin zum neunten Tag p. p. kontinuierlich ab, wobei ab diesem Zeitpunkt keine neutrophilen Granulozyten mehr nachweisbar sind (Belz und Glatzel, 1995). Saltiel et al. (1987) konnte bei diesem Vorgang einen biphasischen Verlauf, mit Tiefstwerten am siebten und 16. Tag p. p., nachweisen. Bei Stuten mit einem verspätetem Nachgeburtsabgang ist am dritten und sechsten Tag nach der Geburt eine höhere Anzahl an neutrophilen Granulozyten, von denen ein hoher Anteil keine Degenerationserscheinungen aufweist, zu finden. Dieser Unterschied ist ab dem neunten Tag p. p. nicht mehr zu beobachten (Belz und Glatzel, 1995).

Während der ersten sechs Tage p. p. befinden sich im Lochialsekret neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen in geringer Konzentration. Ein Auftreten dieser beiden Zellpopulationen ist unabhängig vom Zeitpunkt des Nachgeburtsabganges (Belz und Glatzel, 1995). Eosinophile Granulozyten lassen sich während des gesamten Puerperiums (Saltiel et al., 1987), mit einem Maximum am fünften (Katila, 1988) bzw. sechsten Tag p. p. (Saltiel et al., 1987), in geringer Anzahl nachweisen. Direkt nach der Geburt ist ebenfalls eine relativ große Anzahl Erythrozyten im Lochialsekret zu finden. Abgesehen von einem kurzzeitigem Anstieg am neunten Tag p. p. nimmt deren Menge im Verlauf des Puerperiums jedoch kontinuierlich ab (Saltiel et al., 1987).

Ab dem neunten Tag p. p. stellen Endometriumzellen die dominierende Zellpopulation im Zellausstrich dar (Belz und Glatzel, 1995).

## 2. 2 Prinzip der exfoliativen Endometriumszytologie

### 2. 2. 1 Indikation

Abstriche des Endometriums wurden schon früh in der Humanmedizin etabliert und werden in der Diagnostik von uterinen Erkrankungen der Frau seit langem angewendet (Cary, 1943; Hecht, 1952; Romberg, 1954; Do Ferreira, 1957).

Bei der Stute gibt es zwei Ansätze, die genitale Zytodiagnostik als weiterführendes diagnostisches Mittel zu nutzen (Tillmann und Meinecke, 1980). Zum einen kann sie zur Zyklusdiagnostik und zum anderen zur Erkennung von Endometritiden verwendet werden.

Bei der Zyklusdiagnostik wird der Zellausstrich anhand des 'Funktionszellbildes' interpretiert und ausgewertet. Hierbei wird der zytohormonelle Status durch Interpretation der Morphologie, Ansammlung und Art der Zellen im Ausstrich bestimmt. Dies ist möglich, da die Zellmorphologie des

Genitaltraktes unter dem Einfluss von Östrogenen und Progesteron in den verschiedenen Zyklusabschnitten variiert. Die exfoliative Vaginalzytologie der Hündin ist hierbei eine führende Methode, um den Deckzeitpunkt zu bestimmen (Tammer et al., 1994).

Mit Hilfe von exfoliativen Endometriumszytologien gelangen Freeman et al. (1986) nur eine sehr grobe Zyklusdiagnostik bei der Stute. Sie konnten lediglich vier spezifische Zellbilder unterscheiden, die jeweils einer Phase (Winteranöstrus, Übergangsmuster im Frühjahr, aktives Zellmuster innerhalb der Zuchtsaison und Übergangsmuster im Herbst) mit saisonal unterschiedlicher Reproduktionsaktivität zugeordnet werden konnten.

Jedoch stehen bei der Stute eine Vielzahl anderer erprobter und genauerer Untersuchungsmethoden (rektal palpatorische und ultrasonographische Untersuchung) im Rahmen der Zyklusdiagnostik im Vordergrund, weshalb die exfoliative Endometriumszytologie in der Praxis nicht bei dieser Indikation angewendet wird.

Im Rahmen der speziellen gynäkologischen Untersuchung der Stute spielt die Differentialzytologie der exfoliativen Endometriumszytologie eine wichtige Rolle (Tillmann und Lauer, 1977; Tillmann und Meinecke, 1980). Das Hauptaugenmerk bei der Interpretation der Differentialzytologie liegt darin, ob körpereigene Entzündungszellen, besonders polymorphkernige neutrophile Granulozyten, nachgewiesen werden können oder nicht.

Schon früh wurde auf den diagnostischen Wert der exfoliativen Endometriumszytologie als Bestandteil der gynäkologischen Untersuchung durch Digby et al. (1978) hingewiesen. Er war der Meinung, dass der routinemäßige Gebrauch von zytologischen Untersuchungen die Interpretation bakteriologischer Tupferproben verbessern würde.

Sowohl die Arbeiten von Aguilar et al. (2006) als auch von Walter et al. (2007) bestätigten, dass die Zuchttauglichkeitsuntersuchung neben der klinischen und bakteriologischen Untersuchung, der Entnahme einer Endometriumsbiopsie auch die Anfertigung einer exfoliativen Endometriumszytologie enthalten sollte.

Sowohl bei der Stute und als auch beim Rind (Barlund et al., 2008; Dubuc et al., 2010; Overbeck et al., 2011; Baranski et al., 2012; Couto et al., 2013) liegt das Hauptaugenmerk der exfoliativen Endometriumszytologie in der Erkennung von Endometritiden.

Erstmalig hat Knudsen (1964) die exfoliative Endometriumszytologie zur Erkennung bakteriell bedingter Endometritiden erprobt. Er stellte die Ergebnisse von bakteriologischen Untersuchungen und die Resultate von Endometriumszytologien gegenüber. Hierbei konnte er eine starke Korrelation positiver bakteriologischer Befunde und dem Nachweis von neutrophilen Granulozyten

im zytologischen Ausstrich feststellen. Die Übereinstimmung dieser Resultate ließen Knudsen zu dem Schluss kommen, dass das Ergebnis einer zytologischen Untersuchung zur sicheren Diagnosestellung einer bakteriell bedingten Endometritis ausreichend ist.

Nach diesem ersten Bericht über eine positive Korrelation zwischen bakteriologischem und zytologischem Befund, wurde dieser Zusammenhang durch Untersuchungen verschiedener Autoren bestätigt (Tillmann und Meinecke, 1980; Knudsen, 1982; Couto und Hughes, 1984; Slusher et al., 1984; Brook, 1985; Ball et al., 1988; Reinemund, 1988; Walter und Wehrend, 2007; Walter et al., 2012).

In einer Studie von Reinemund (1988) an 129 Stuten korrelierten die Befunde der bakteriologischen mit zytologischen Untersuchungen in 81,4 % der Fälle. 8,5 % der Untersuchungen wiesen ein negatives Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung bei gleichzeitigem positivem Befund in der zytologischen Untersuchung auf. Daneben waren 10,1 % der Proben zytologisch negativ und bakteriologisch positiv.

Im Rahmen einer früheren Untersuchung an 134 Stuten konnte diese Korrelation in 79 % der Fälle bestätigt werden, während 5 % der Untersuchungen zytologisch negativ und bakteriologisch positiv waren, weitere 8 % waren zytologisch positiv und bakteriologisch negativ (Brook, 1985).

Riddle et al. (2007) konnte lediglich bei 64 % der untersuchten Stuten Entzündungsanzeichen in der zytologischen Untersuchung bei gleichzeitigem positivem Befund der bakteriologischen Untersuchung nachweisen.

Der Zusammenhang zwischen der Besiedelung des Uterus mit genitalpathogenen Keimen und darauf folgender entzündlicher Reaktion des Endometriums in Form einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten konnte gezeigt werden. Hierbei kam es bereits nach zwei Stunden zu einer neutrophilen Reaktion, die ihr Maximum nach sechs bis zehn Stunden erreicht hatte, in Folge einer intrauterinen Inokulation eines bakterienfreien Filtrates aus *Streptococcus zooepidemicus* (Couto und Hughes, 1985).

Neuberg (2009) konnte in einer Studie mit 233 Stuten zeigen, dass mit Hilfe des CytologyBrush® für Stuten (Fa. Minitüb, Tiefenbach) signifikant häufiger neutrophile Granulozyten bei Stuten mit einem positiven mikrobiellen Befund von  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken im Ausstrich nachweisbar sind, als bei Stuten bei denen keine  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken nachgewiesen werden konnten. Außerdem konnte er zeigen, dass eine positive Korrelation zwischen dem zunehmenden Keimgehalt an  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken und der Anzahl von neutrophilen Granulozyten im Ausstrich besteht.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass weder der Nachweis von  $\beta$ -hämolyisierenden

Streptokokken und *Escherichia coli* in Reinkultur, noch in Mischkultur mit apathogenen oder pathogenen Keimen das Resultat der zytologischen Untersuchung beeinflussen kann (Neuberg, 2009).

Hinsichtlich des Nachweises von neutrophilen Granulozyten bei genitalgesunden Stuten gibt es verschiedene Angaben. Histologische Untersuchungen von Kenney (1978) haben gezeigt, dass während der Rosse neutrophile Granulozyten in das Uterine Lumen migrieren können.

Im Gegensatz dazu konnten verschiedene Autoren keine Entzündungszellen dieses Typs bei genitalgesunden Stuten im zytologischen Ausstrich nachweisen (Knudsen, 1964; Tillmann und Lauer, 1977; Wingfield Digby und Ricketts, 1982).

Dagegen sind bei Stuten, die keinerlei klinische Hinweise einer Endometritis oder Infektion zeigen, auch keine Entzündungszellen in der zytologischen Untersuchung feststellbar (Digby, 1978).

Hinsichtlich der schnellen Verfügbarkeit der Ergebnisse ist die exfoliative Endometriumszytologie der bakteriologischen Untersuchung überlegen (Knudsen, 1964; Digby, 1978; Nielsen, 2005; Walter und Wehrend, 2007). Dies ist möglich, da die Proben der zytologischen Untersuchung schnell vor Ort aufgearbeitet und interpretiert werden können. Deren Ergebnisse sind noch am selben Tag verfügbar und eine Entzündung des Endometriums kann nachgewiesen werden. Die Resultate der bakteriologischen Untersuchung liegen in aller Regel erst nach 48 bis 72 Stunden vor.

Das rasche Vorliegen eines Untersuchungsbefundes ist besonders hilfreich, falls eine Ovulation kurz bevor steht und keine Zeit mehr für eine bakteriologische Untersuchung zur Verfügung steht (Couto und Hughes, 1984).

Die zytologische Untersuchung hatte für Knudsen (1982) eine außergewöhnlich wichtige Bedeutung. Nur Stuten mit einem negativen Resultat der exfoliativen Endometriumszytologie wurden von ihm zur Bedeckung zugelassen und nur bei Tieren mit einem positiven Befund wurde eine bakteriologische Untersuchung durchgeführt.

Im Zeitraum von 1978 bis 1981 wurden für eine Studie insgesamt 4024 Stuten sowohl bakteriologisch als auch zytologisch untersucht. Die Autoren dieser Untersuchung kamen zu dem Schluss, dass die zytologische Untersuchung eine direktere Nachweismethode einer akuten Endometritis ist und die bakteriologische Untersuchung lediglich ein indirektes Verfahren zur Detektion einer solchen Uteropathie darstellt (Wingfield Digby und Ricketts, 1982). Deshalb hielten Wingfield Digby und Ricketts (1982) die Endometriumszytologie für ein besseres Diagnostikum, um eine akute Endometritis zu erkennen.

Besonders bei der Erkennung symptomarmer Endometritiden hat sich die Endometriumszytologie als hilfreiches diagnostisches Mittel erwiesen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die zytologische

der bakteriologischen Untersuchung bei der Erkennung dieser Form von Endometritiden deutlich überlegen ist (Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Riddle et al., 2007).

Zu diesem Ergebnis kam auch Digby (1978) in einer Untersuchung an Stuten, die vorberichtlich unter persistierender Endometritis litten. Bei 91 % dieser Stuten konnten mit Hilfe einer zytologischen Untersuchung eine akute Endometritis nachgewiesen werden. Ein positives bakteriologisches Resultat lag jedoch nur bei 45 % vor.

Bei der Erkennung von subklinischen Endometritiden ist die exfoliative Endometriumszytologie als alleiniges diagnostisches Mittel jedoch nicht ausreichend. Bei einer Studie mit 55 Stuten wurden Proben mit dem Uteruskulturtupfer sowie dem CytologyBrush® (Minitüb, Tiefenbach) entnommen und gleichzeitig Endometriumsbiopsien gewonnen. Bei allen Proben wurden sowohl bakteriologische als auch zytologische Untersuchungen durchgeführt. Der Nachweis von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten im Stratum compactum durch die pathohistologische Untersuchung wurde als "*best standard*" festgelegt. Die Autoren konnten zeigen, dass eine alleinige zytologische oder bakteriologische Untersuchung einen sehr hohen Anteil an falsch negativen Ergebnissen aufwies. Mit einer Kombination beider Methoden konnte die Sensitivität für die Erkennung subklinischer Endometritiden deutlich gesteigert werden (Overbeck et al., 2011).

Weiterhin kann die exfoliative Endometriumszytologie auch dazu genutzt werden, eine Prognose über die Etablierung einer Trächtigkeit zu treffen.

Eine der ersten Untersuchungen hierzu wurde von Mattos et al. (1984) an 119 Stuten durchgeführt. Die Autoren konnten zeigen, dass die Konzeptionsrate bei zytologisch unauffälligen (65 Tiere) oder nach Behandlung unauffällig gewordenen Stuten (14 Tiere) bei 63,1 bzw. 64,3 % nach Besamung lag. Von zehn Stuten, deren zytologische Untersuchung ein negatives Ergebnis aufwies, wurden neun nach Bedeckung tragend (Mattos et al., 1984).

Andererseits wiesen Stuten (n = 21), mit einem Nachweis von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten im Ausstrich, lediglich eine Konzeptionsrate von 4,8 % nach Besamung auf. Von neun Stuten, bei denen ebenfalls polymorphkernige neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden konnten, wurde kein Tier durch Bedeckung tragend.

Eine größere Studie mit 190 Stuten kam zu ähnlichen Ergebnissen. Hierbei wurden die Resultate der zytologischen Untersuchungen in sechs Kategorien eingeteilt (Tabelle 1). Die Kategorisierung erfolgte hauptsächlich nach der Anzahl neutrophiler Granulozyten und der Präsenz bzw. dem Fehlen von Endometriumzellen pro Gesichtsfeld bei 1000facher Vergrößerung (LaCour, 1985).

Tabelle 1: Kategorisierung der Endometriumszytologien nach LaCour, 1985

(EZ = Endometriumzellen, PMN = neutrophile Granulozyten, % = Prozent,  
GF = Gesichtsfeld bei 1000facher Vergrößerung, EED = früheembryonale Resorptionsrate)

Kategorie	Zellbild	Konzeptionsrate in %	EED in %
0	Mehrheitlich EZ sehr wenig Zelltrümmer	87	3
1	EZ in Klumpen angeordnet etwas Zelltrümmer und Schleim vereinzelt mononukleäre Zellen	87	3
2	Abnehmende Anzahl und Größe von EZ vereinzelte Erythrozyten vermehrt Zelltrümmer weniger als 1 PMN pro GF	86	3
3	Vereinzelt intakte EZ viel Zelltrümmer, viele Erythrozyten, Makrophagen 2 – 3 PMN pro GF	50	17
4	Zelltrümmer, Erythrozyten > 3 PMN pro GF	25	50
5	Ausschließlich PMN, z.T. degeneriert	25	50

Stuten mit einem Zytologieergebnis der Kategorien 0 bis 2 hatten eine nahezu ungestörte Konzeptionsrate von 87 bzw. 86 %, während das Befruchtungsergebnis der Kategorie 3 schon auf 50 % abgefallen war. Stuten der Kategorien 4 und 5 wiesen lediglich eine Konzeptionsrate von 25 % auf. Die frühembryonale Resorptionsrate lag bei Stuten mit einem Zytologieergebnis der Kategorie 0 bis 2 bei nur 3 %. Ab der Kategorie 3 steigt die frühembryonale Resorptionsrate jedoch auf 17 % und in der Kategorie 5 und 6 auf 50 % an. Somit konnte auf Grund der Kategorisierung der zytologischen Untersuchungsergebnisse eine aussagekräftige Prognose hinsichtlich der Etablierung einer Trächtigkeit und der embryonalen Resorptionsrate gestellt werden.

In einer aktuellen Studie mit 2044 Proben an 970 Stuten in den Zuchtjahren 2001 bis 2004 konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Gesichtsfeld im Ausstrich und der Trächtigkeitsrate besteht (Tabelle 2) (Riddle et al., 2007).

Tabelle 2: Zusammenhang zwischen Trächtigkeitsrate und zytologischem Befund (PMN = neutrophile Granulozyten, % = Prozent, 1000fache Vergrößerung) (Riddle et al., 2007)

<b>Kategorie</b>	<b>PMN pro Gesichtsfeld</b>	<b>Trächtigkeitsrate in %</b>
Normal	0 bis 2	59
Moderate Entzündung	2 bis 5	48
Schwere Entzündung	> 5	21

Die Trächtigkeitsrate bei Stuten mit nur 0 bis 2 neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld war mit 59 % am höchsten. Bei Stuten mit einer moderaten bzw. schweren Entzündung waren die Trächtigkeitsergebnisse mit 48 bzw. 21 % deutlich reduziert.

### 2. 2. 2 Entnahmetechnik

Bevor intrauterine Proben entnommen werden können, muss die Stute vorbereitet werden. Dabei wird die Stute fixiert, der Schweif eingebunden, die Vulva mit einer milden Wasser-Seifen- oder einer Povidon-Jod-Lösung gereinigt und anschließend mit sauberen Tüchern abgetrocknet (Brook, 1985; LaCour, 1985; Ley et al., 2001; Dascanio, 2003; Card, 2005). Danach kann der untersuchende Tierarzt mit Gleitgel und einem schulterlangen Einmalhandschuh, der nur bei manueller Einführung des Entnahmesystems durch die Zervix benötigt wird (Couto und Hughes, 1984), mit der Probenentnahme beginnen (Ley et al., 2001).

Bei den Entnahmesystemen lassen sich bedeckte und unbedeckte Systeme unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass für die Entnahme bakteriologischer Proben aus dem Cavum uteri nur doppelt geschützte Systeme verwendet werden sollten (Blanchard et al., 1981).

Bei unbedeckten Entnahmesystemen können die Proben unbewusst mit Mikroorganismen aus dem kaudalen Genitaltrakt kontaminiert werden. Dies hat falsch positive Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung zur Folge und beeinflusst negativ die Korrelation der zytologischen und bakteriologischen Ergebnisse (Shin et al., 1979; Wingfield Digby und Ricketts, 1982).

Das Ergebnis der exfoliativen Endometriumszytologie kann durch die Wahl des Entnahmessystems stark variieren. Bei Proben, die mit einem unbedeckten Entnahmesystem angefertigt wurden, muss der Nachweis neutrophiler Granulozyten kritisch gesehen werden (Aguilar et al., 2006). Aguilar et al. (2006) konnten bei 87,8 % der Proben, die mit bloßem Finger entnommen wurden, neutrophile Granulozyten nachweisen. Gleichzeitig wurden nur bei 7,3 % der doppelt geschützt entnommenen zytologischen Präparate neutrophile Granulozyten nachgewiesen.

In der gleichen Studie konnten Aguilar et al. (2006) die Ergebnisse von Brook (1993) bestätigen, dass neutrophile Granulozyten zur physiologischen Zellpopulation der Vaginalzytologie beim Pferd gehören. Über das Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten in der equinen Zervix gibt es verschiedene Angaben. Während Walter (2006) lediglich bei drei von 21 untersuchten, klinisch unauffälligen Stuten neutrophile Granulozyten nachweisen konnte, gelang Aguilar et al. (2006) und Brooks (1992) der Nachweis, dass neutrophile Granulozyten jederzeit bei Stuten mit ungestörtem Reproduktionsstatus in der Zervix nachweisbar sind.

Um eine intrauterine Probe zu entnehmen, kann das Entnahmesystem sowohl manuell als auch mit Hilfe eines sterilen Spreizspekulums nach Polanski eingeführt werden. Bei zuletzt genannter Methode ist jedoch zu beachten, dass das Einführen eines Spekulum einen Luftestrom in die Vagina zu Folge hat, was besonders bei Maidenstuten mit einem teilweise geöffneten Muttermund als ungünstig anzusehen ist (LeBlanc, 2011).

Bei der manuellen Einführung der Entnahmesysteme trägt der Tierarzt einen schulterlangen Untersuchungshandschuh und benetzt seinen Handrücken mit einer kleinen Menge Gleitgel. Danach umfasst er das Entnahmesystem mit seiner Handfläche. Auf diese Weise führt er es durch die Vulva bis zur Portio vaginalis. Sobald das Os externum cervicis identifiziert ist, wird die Zervix vorsichtig manuell geweitet und das Entnahmegerät in das Cavum uteri eingeführt. Danach kann der innere bzw. geschützte Tupfer vorgeschoben und die Probe entnommen werden (Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Couto und Hughes, 1984; Brook, 1993; Ley et al., 2001).

Für die bedeckte Entnahme zytologischer Proben aus dem Cavum uteri stehen der sterilisierbare Knudsenkatheter, verschiedene kommerzielle Einmaltupfersysteme, CytologyBrush® (Minitüb,



Tiefenbach), Kalayjian culture instrument® (Kalayjian Industries, California, USA), Stieltupfer und eine uterine Lavage zur Verfügung (Brook, 1993; Bourke et al., 1997; Dascanio et al., 1997; Neuberg, 2009; Cocchia et al., 2012; Walter et al., 2012).

Der Knudsenkatheter wurde nach Knudsen (1964) benannt, da dieser die exfoliative Endometriumszytologie bei der Stute etablierte. Er besteht aus einem starren Metallstab, an dessen Spitze sich eine Bohrung für die Befestigung eines Stück Baumwollstoffes und dahinter eine Metallspirale befindet. Da der Baumwollstoff für die bakteriologische Untersuchung und das an der Metallspirale anheftende Zellmaterial für die zytologische Untersuchung genutzt werden kann, ist es möglich, beide Untersuchungsmaterialien in einem Arbeitsschritt zu erhalten.

Der Stieltupfer wurde von Mattos et al. (1984) verwendet. Dabei wird ein handelsüblicher Stieltupfer an der Spitze eines entkeimten Klinikstupferentnahmegerätes nach Merkt mit Hilfe eines Spreizspekulums nach Polanski unter Sichtkontrolle in die Gebärmutter verbracht und durch dreimaliges Vor- und Zurückbewegen der Kontakt mit dem Endometrium sichergestellt.

Ein bereits seit langem etabliertes Verfahren zur Anfertigung exfoliativer Endometriumszytologien ist die Verwendung kommerziell erhältlicher Einmal-Baumwolltupfer (Digby, 1978; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Brook, 1993; Card, 2005; Neuberg, 2009; Cocchia et al., 2012; Walter et al., 2012), welche durch Rotationsbewegungen und gleichzeitigem Vor- und Zurückschieben innerhalb des Uterus Zellen aufnehmen können (Bourke et al., 1997). Es ist zu beachten, dass eine ausreichende Benetzung des Tupfers mit Zellen und Mikroorganismen nur erreicht wird, wenn der Tupfer für mindestens 30 Sekunden Kontakt mit dem Endometrium hat (Schmidt, 1988). Falls für die Anfertigung eines zytologischen Ausstriches ein steriler Objektträger verwendet wird, kann der Tupfer anschließend für eine bakteriologische Untersuchung genutzt werden.

Während des Ausrollens können sich Fäden des Baumwolltupfers lösen und die Auswertung des Ausstriches erschweren (Britton, 1982), weshalb Couto und Hughes (1984) die Verwendung von Calcium-Alginat-Tupfern präferieren. Die Einmal-Baumwolltupfer dürfen nur seitlich über das Endometrium gerollt werden, um ein Ablösen von Fasern zu vermeiden. Um die Zellzahl und Qualität des Ausstriches zu verbessern, kann der Tupfer vor der Probenentnahme mit steriler Kochsalzlösung befeuchtet werden (Dascanio et al., 1997).

In den letzten Jahren hat sich neben den Einmal-Baumwolltupfern die Verwendung von Zytologie-Bürstchen, als doppelt geschütztes Entnahmesystem, etabliert (Bourke et al., 1997; Neuberg, 2009; Overbeck et al., 2011; Cocchia et al., 2012; Walter et al., 2012). Dieses Entnahmesystem wurde bereits bei der Frau erfolgreich zur Anfertigung von Endozervikalzytologien verwendet (Trimbos und Arentz, 1986; Hjärsing et al., 1991; Valenzuela et al., 1995). Im Gegensatz zum Einmal-

Baumwolltupfer besitzen die Zytologie-Bürstchen an ihrer Spitze eine kleine Bürste, die durch Hin- und Her- sowie Drehbewegungen Zellmaterial aufnimmt (Bourke et al., 1997).

In einer Studie von Bourke et al. (1997) wurden ein Zytologie-Bürstchen und ein Baumwolltupfer verglichen. Die Autoren kamen zu dem Resultat, dass Zytologien, die mit einem Bürstchen angefertigt wurden, deutlich mehr auswertbare Zellen pro Gesichtsfeld aufweisen. Dieses Ergebnis wurde von mehreren Autoren bestätigt (Neuberg, 2009; Cocchia et al., 2012).

In einer Studie mit 233 Stuten hat Neuberg (2009) den Knudsen-Katheter (Fa. Laborgeräte Reinke, Gießen), CytologyBrush® (Fa. Minitüb, Tiefenbach) und Uteruskulturtupfer (Fa. Minitüb, Tiefenbach) zur Gewinnung von intrauterinen zytologischen Proben bei Zuchtstuten verwendet. Die Untersuchung erfasste den Nachweis neutrophiler Granulozyten im Ausstrich und die Anzahl auswertbarer Proben im Vergleich.

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem Knudsen-Katheter der Nachweis neutrophiler Granulozyten am häufigsten gelang. Mit Hilfe des CytologyBrush® konnten neutrophile Granulozyten signifikant häufiger als mit dem Uteruskulturtupfer nachgewiesen werden. Der Nachweis von Erythrozyten gelang am häufigsten mit dem CytologyBrush®. Außerdem waren bei Proben, die mit dem Uteruskulturtupfer entnommen wurden, signifikant häufiger Deformationen an den Zellen erkennbar. Bei Proben, die mit CytologyBrush® angefertigt wurden, waren am meisten Endometriumzellen pro Gesichtsfeld sichtbar.

Signifikant mehr Proben, die auf Grund von zu wenig Zellmaterial nicht auswertbar waren, wurden mit Hilfe des Knudsen-Katheters entnommen und angefertigt.

Ein weiteres Entnahmegerät ist das sogenannte Kalayjian culture instrument® (Kalayjian Industries, California, USA), welches besonders in den USA verwendet wird. Dieses System besteht aus einer Kappe an der Spitze, um Zellmaterial für eine zytologische Untersuchung aufzunehmen, und einem Calcium-Alginat-Tupfer für eine bakteriologische Untersuchung. Das entnommene zytologische Material wird ähnlich wie bei einem Blutaussstrich auf einen Objektträger aufgetragen und anschließend mit einem Zweiten ausgestrichen. Im Vergleich zu mit Baumwolltupfern entnommenen Proben weisen diese merklich weniger Zelldeformationen auf. Beim Ausführen des Entnahmesystems ist darauf zu achten, dass man es mit der Handfläche abdeckt, um eine Kontamination mit Zellen aus Zervix und Vagina zu vermeiden, da es sich lediglich um ein einfach geschütztes System handelt (Dascanio et al., 1997).

Ein Nachteil der beschriebenen Methoden ist, dass die angefertigten Präparate nur den lokalen Zustand des Endometriums am Entnahmebereich widerspiegeln (Roszel und Freeman, 1988). Dies trifft aber auch auf die Uterustupferprobe und Uterusbiopsie zu.

Die Low-Volume-Uterus-Flush-Technik ermöglicht die Beurteilung eines größeren Teils der Oberfläche des Endometriums (Dascanio et al., 1997), was sich besonders bei subfertilen Stuten bewährt hat (Ball et al., 1988). Auf Grund einer besseren Qualität der Zellmorphologie sind zytologische Proben, die mit der Low-Volume-Uterus-Flush-Technik angefertigt wurden, besser auszuwerten als Proben, die mit Baumwolltupfern entnommenen wurden (Dascanio et al., 1997).

Dabei werden mit Hilfe eines Ballonkatheters 60 ml sterile physiologische Kochsalzlösung durch die Zervix in den Uterus instilliert. Um die Flüssigkeit möglichst gleichmäßig zu verteilen wird die Gebärmutter für mindestens 30 Sekunden von rektal massiert. Anschließend wird so viel Spülflüssigkeit wie möglich wieder entnommen, in ein steriles Behältnis gefüllt und bei 410 rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Der dadurch entstandene Überstand wird verworfen bis nur noch fünf ml Flüssigkeit im Reagenzglas verbleiben.

Das angefertigte Sediment kann sowohl für eine bakteriologische Untersuchung als auch für die Anfertigung von zytologischen Proben genutzt werden (LeBlanc et al., 2007).

Eine Erweiterung des oben beschriebenen Verfahrens ist die Uteruslavage. Hierbei wird mit Hilfe eines Lavageschlauches ein Liter sterile Kochsalzlösung in den Uterus instilliert und dieser anschließend ebenfalls von rektal massiert. Die Rückgewinnung und Aufbereitung läuft wie bei der Low-Volume-Uterus-Flush-Technik ab. Jedoch muss bei diesem Spülverfahren mit deutlich mehr Zeit- und Materialaufwand gerechnet werden und das Endometrium wird stärker irritiert als bei der Verwendung eines Baumwolltupfers (Dascanio, 2003).

In einer prospektiven Studie wurde sechs Tage nach der Ovulation bei jeweils drei Stuten, mit einer intrauterinen Infusion einer Ringer-Laktat-Lösung oder ViGro™ Complete Flush Solution eine Endometritis ausgelöst. Zwei Tage nach der induzierten Entzündung wurden uterine Zellproben, jeweils mit einem Baumwolltupfer (Gaine Continental; Continental Plastic, Delavan, WI), einem Zytologie-Bürstchen aus der Humanmedizin (VWR Canlab, Mississauga, Ontario, Canada) und mit Hilfe einer Low-Volume-Uterus-Flush-Technik entnommen. Diese wurden hinsichtlich der Detektion von neutrophilen Granulozyten, der Anzahl von Endometriumzellen im Ausstrich und der Qualität der zytologischen Proben ausgewertet.

Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die mit den Zytologie-Bürstchen angefertigten Proben von signifikant besserer Qualität als die mit Hilfe der Low-Volume-Uterus-Flush-Technik angefertigten Proben waren. Proben, die mit dem Zytologie-Bürstchen oder einem Baumwolltupfer entnommen und angefertigt wurden, unterschieden sich nicht hinsichtlich der Qualität.

Der Nachweis neutrophiler Granulozyten und die Anzahl der Endometriumzellen gelang mit allen drei Entnahmesystemen gleich gut (Defontis et al., 2011).

### 2. 2. 3 Entnahmezeitpunkt

Über den optimalen Zeitpunkt zur Entnahme von intrauterinen Proben zur zytologischen Untersuchung bei der Stute gibt es verschiedene Angaben.

Da die equine Zervix unabhängig vom Zyklusstand manuell geweitet werden kann, ist die Probenentnahme prinzipiell jederzeit möglich (Shin et al., 1979; Hughes, 1980).

Eine Vielzahl von Autoren empfiehlt jedoch die Entnahme während der Rosse (Conboy, 1978; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Couto und Hughes, 1984; LaCour, 1985; Nielsen, 2005).

Dabei sollte bei der rektal sonographischen Untersuchung im B-Mode-Verfahren ein Uterusödem und ein über 30 Millimeter im Diameter großer Follikel deutlich sichtbar sein (Aguilar et al., 2006).

Zu diesem Zykluszeitpunkt erlaubt der relaxierte Muttermund eine leichte transzervikale Passage der Entnahmegерäte in den Uterus (Conboy, 1978; Couto und Hughes, 1984). Hinzu kommt, dass durch die endometriale Sekretion eine ausreichende Menge an Material mit dem Entnahmegерät in Berührung kommt, um eine repräsentative Aussage zu treffen.

In Bezug auf diesen Aspekt konnte gezeigt werden, dass Stuten mit chronisch subklinischen Endometritiden einen hohen Anteil falsch negativer Zytologieergebnisse aufwiesen, falls die Probenentnahme außerhalb der Rosse erfolgte (Brook, 1993).

Die Mitte des Östrus ist zur Entnahme von zytologischen Proben bei der Stute zu bevorzugen (Ricketts und Mackintosh, 1987). Hierbei haben die uterinen Abwehrmechanismen ihr Maximum erreicht (Waelchli et al., 1993).

Die Möglichkeit einer iatrogenen Infektion besteht vor allem im Diöstrus, da mit steigendem Progesteronspiegel die Abwehrmechanismen des Uterus herabgesetzt werden (Brook, 1993; Waelchli et al., 1993; Katila, 1996).

Bei der Stute konnte gezeigt werden, dass unter steigender Progesteroneinwirkung die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der Zervikalzytologie abnimmt (Walter, 2006).

Falls der Zeitraum bis zur nächsten Ovulation für therapeutische Maßnahmen genutzt werden soll, kann es indiziert sein die Proben für zytologische Untersuchung auch außerhalb der Rosse zu entnehmen (Waelchli et al., 1993).

### 2. 2. 4 Probenaufbereitung

Zytologische Proben, die mit einem Zytologie-Bürstchen, Baumwolltupfer oder Kalayjian culture instrument<sup>®</sup> (Kalayjian Industries, California, USA) aus der Gebärmutter entnommen wurden sollten sofort auf einem Objektträger ausgerollt werden (LeBlanc, 2011). Die zentrifugierten und dekantierten Proben der Low-Volume-Uterus-Flush-Technik werden mit Hilfe eines

Baumwolltupfers auf einem Objektträger ausgerollt (LeBlanc et al., 2007).

Endometriumsbiopsien können neben der histologischen Untersuchung auch zur Herstellung von exfoliativen Endometriumszytologien genutzt werden. Hierbei wird die histologische Probe direkt nach der Entnahme über einen Objektträger ausgestrichen und anschließend zur weiteren histologischen Aufbereitung verwendet (Overbeck et al., 2011).

Die ausgestrichenen Präparate können für wenige Minuten luftgetrocknet werden (Knudsen, 1964; Mattos et al., 1984; Brook, 1985; LaCour, 1985; Neuberg, 2009; LeBlanc, 2011; Walter et al., 2012).

Luftgetrocknete Präparate haben den Vorteil, dass sie, im Vergleich zu direkt gefärbten Präparaten, eine höhere Zellzahl aufweisen, da während des Färbeverfahrens weniger Zellen verloren gehen.

Jedoch hat dieses Verfahren einen Verlust an zellulärer Detailerkennbarkeit zur Folge. Zytologische Ausstriche, die viel Schleim enthalten und luftgetrocknet werden, färben sich später dunkel an. Dadurch kann in der darauffolgenden Auswertung eine Zellidentifikation erschwert werden.

Die zelluläre Detailerkennbarkeit kann erhalten bleiben, indem das Färbeverfahren direkt im Anschluss an die Anfertigung des Ausstriches erfolgt und dadurch der noch feuchte Schleim durch die Färbelösungen abgewaschen werden kann (Ley et al., 2001; LeBlanc, 2011).

Außerdem hat die Lufttrocknung des zytologischen Ausstriches eine Vergrößerung der Zellen, eine mangelhafte Affinität der einzelnen Zellbestandteile für die Farbstoffe des Färbeverfahrens zu Folge, was zu einer erschwerten Auswertbarkeit und Interpretation führen kann (Couto und Hughes, 1984).

Ley (1986) kam jedoch zu anderen Erkenntnissen. Seiner Meinung nach sind zytologische Präparate, die 48 Stunden nach der Entnahme fixiert und gefärbt wurden, ohne Probleme auswertbar.

Falls Proben nicht innerhalb von 24 Stunden gefärbt werden können, sind Descanio et al. (1997) der Meinung, dass die Proben fixiert werden müssen. Falls die Fixierung nicht rechtzeitig erfolgt, können die Zellkerne unregelmäßig und pink auf Grund einer verminderten Affinität für basische Farbstoffe erscheinen (Dascanio, 2003).

Die zytologischen Präparate können mit hochprozentigen Ethanol (Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Freeman et al., 1986)- bzw. Methanollösungen, Äther-Alkoholgemisch (1:1) (Tillmann und Meinecke, 1980) oder einem handelsüblichen Fixationspray (Couto und Hughes, 1984; Ley et al., 2001) fixiert werden.

Zur Färbung der Präparate stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. In den ersten Untersuchungen von Knudsen (1964) wurden die Ausstriche mit einer Orcein-Färbung gefärbt.

Später wurden in Studien Sano's Modifikation der Pollack Trichome Färbemethode verwendet

(Digby, 1978; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Freeman et al., 1986; Brook, 1993), welche zuerst für das Anfärben von Peritonealflüssigkeit angewandt wurde (Bach, 1973). Der Vorteil dieser Färbung liegt darin, dass der Zellkern und das Zytoplasma gut zu unterscheiden sind und dadurch eine Zelldifferenzierung auch bei Zellansammlungen möglich ist. Jedoch dürfen die Ausstriche vor dem Färben nicht getrocknet werden (Roszel und Freeman, 1988).

Eine weitere Methode ist die Färbemethode nach Pendel modifiziert nach Schnorr, die von Tillmann und Meinecke (1980) beschrieben wurde, sich jedoch nicht in der Routinediagnostik durchgesetzt hat.

Die Papanicolaou-Shorr-Färbung ist eine weitere Färbemethode für Endometriumszytologien. Jedoch ist die Färbedauer mit insgesamt 60 Minuten sehr lang und wird deshalb kaum in der Praxis angewendet (Walter, 2006; Walter et al., 2011).

Die wahrscheinlich am häufigsten verwendete Färbemethode ist die Diff-Quick-Färbung<sup>®</sup>. Sie ist schnell und einfach durchzuführen und liefert gute differenzierbare Präparate (Couto und Hughes, 1984; Brook, 1993; Ley et al., 2001; Walter und Wehrend, 2007; Neuberg, 2009; Overbeck et al., 2011; Cocchia et al., 2012; Walter et al., 2012). Diese Methode hat sich hinsichtlich der Erkennung von neutrophilen Granulozyten im Ausstrich gegenüber der Papanicolaou-Shorr-Färbung als überlegen erwiesen (Walter et al., 2011).

Um weiterführende Diagnostik zu betreiben, können mehrere separate Ausstriche anfertigt werden. Dies ermöglicht einen raschen Informationsgewinn bevor der Befund der bakteriologischen Untersuchung vorliegt (Dascanio, 2003). Mit Hilfe der zusätzlichen Ausstriche lassen sich durch Spezialfärbungen Bakterien, Bakterienkapseln und Pilze nachweisen (Couto und Hughes, 1984). Mit einer Gram-Färbung sind ein Nachweis und eine grobe Differenzierung von Bakterien im Ausstrich möglich (Shin et al., 1979; Dascanio, 2003).

## 2. 3 Interpretation der exfoliativen Endometriumszytologie

### 2. 3. 1 Mikroskopische Untersuchung

Mit Hilfe eines Lichtmikroskopes kann die Auswertung und Interpretation der exfoliativen Endometriumszytologien erfolgen (Neuberg, 2009; LeBlanc, 2011; Overbeck et al., 2011; Cocchia et al., 2012; Walter et al., 2012). Zuerst werden die Proben unter geringer Vergrößerung durchmustert (Dascanio, 2003). Manche Autoren empfehlen hierfür eine 40- (Dascanio, 2003) bzw. 200fache Vergrößerung (Neuberg, 2009; Walter et al., 2012). Hierbei ist besonders auf die Verteilung und Anzahl der Zellen (Neuberg, 2009), sowie auf Zelldeformationen (Neuberg, 2009) zu achten, um eine sichere und aussagekräftige Untersuchung durchführen zu können (Dascanio et al., 1997).

In einer Studie von Riddle et al. (2007) wurden 2123 zytologische Proben angefertigt und untersucht. Lediglich 79 (3,6 %) der Präparate wurden wegen einer zu geringen Zellzahl aussortiert, wobei 44 dieser 79 Zytologien bei Maidenstuten entnommen worden. Die Autoren führten dies darauf zurück, dass die Zervix bei Maidenstuten oftmals nicht ausreichend relaxiert ist und dadurch eher eine zervikale als eine uterine Zellprobe entnommen wird. Außerdem ist die uterine Sekretion bei Maidenstuten erniedrigt, was ebenfalls eine nicht ausreichende Zellularität des Ausstriches zur Folge haben kann (Riddle et al., 2007).

Desweiteren kann die Wahl des Entnahmesystems die Zellzahl und Deformationen der Zellen im Ausstrich beeinflussen. Neuberg (2009) hat den CytologyBrush<sup>®</sup> für Stuten (Fa. Minitüb, Tiefenbach), den Knudsen-Katheter und den Uteruskulturtupfer für Pferde (Fa. Minitüb, Tiefenbach) miteinander verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei dem CytologyBrush<sup>®</sup> (1,4 %), gefolgt von dem Uteruskulturtupfer (3,5 %) und dem Knudsen-Katheter (35,7 %) die wenigstens Proben auf Grund von Geringzelligkeit aus der Studie ausgeschlossen werden mussten. Außerdem führt der CytologyBrush<sup>®</sup> signifikant seltener zu Zelldeformationen als der Uteruskulturtupfer und zu mehr Endometriumzellen pro Gesichtsfeld, als die beiden anderen Entnahmesysteme.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Studie mit 20 Stuten bei der der CytologyBrush<sup>®</sup>, der Uteruskulturtupfer und die Low-Volume-Flush-Technik miteinander verglichen wurden. Die Autoren konnten zeigen, dass zytologische Ausstriche, die mit dem CytologyBrush<sup>®</sup> angefertigt wurden, die höchste Zelldichte aufwiesen. Der Uteruskulturtupfer konnte signifikant mehr Zellen als die Low-Volume-Flush-Technik nachweisen. Zusätzlich konnten mit dem Uteruskulturtupfer (87 %) mehr intakte Zellen als mit dem CytologyBrush<sup>®</sup> (57 %) und der Low-Volume-Flush-Technik

(41 %) im Ausstrich erkannt werden (Cocchia et al., 2012).

Das Verhältnis der Endometriumzellen zu den neutrophilen Granulozyten bildet die Grundlage der Interpretation des zytologischen Ausstriches (Couto und Hughes, 1985; Ricketts und Mackintosh, 1987; Ball et al., 1988). Somit führt eine Geringzelligkeit des Präparates dazu, dass eine korrekte Beurteilung nahezu unmöglich ist (Dascanio et al., 1997) und der Zustand des Endometriums nicht repräsentativ beurteilt werden kann (Dascanio, 2003). Dies macht eine erneute Probenentnahme notwendig (Dascanio, 2003).

Um eine genaue Zelldifferenzierung und Interpretation des Ausstriches durchführen zu können, werden stärker auflösende Vergrößerungen gewählt (Couto und Hughes, 1984; LaCour, 1985; Dascanio, 2003; Riddle et al., 2007; Neuberg, 2009; Cocchia et al., 2012; Walter et al., 2012). Bereits eine 100fache Vergrößerung halten einige Autoren für ausreichend, um die einzelnen Zelltypen voneinander zu entscheiden (Couto und Hughes, 1984; LaCour, 1985). Ab einer 240 (Knudsen, 1964) bzw. 400fachen Vergrößerung (Couto und Hughes, 1984; Dascanio, 2003; Neuberg, 2009; Walter et al., 2012) stellt eine genaue Zelldifferenzierung kein Problem mehr dar. Die Untersuchung unter Ölemulsion kann bereits ab 400facher Vergrößerung (Couto und Hughes, 1984) erfolgen und ist spätestens ab 1000facher Vergrößerung (Card, 2005; Riddle et al., 2007) notwendig.

### 2.3.2 Endometriumzellen

In der exfoliativen Endometriumszytologie sind die Endometriumzellen die am häufigsten nachgewiesene Zellpopulation.

Das einschichtige Epithel des Endometriums besteht aus Zellen mit Zilien und sekretorischen Zellen ohne Zilien (Kenney, 1978). Jedoch zerfällt der ursprünglich vorhandene Zilienbesatz leicht und ist deshalb im Ausstrich selten zu sehen. In der exfoliativen Endometriumszytologie stellt sich das Epithel in der Dorsalansicht als eine undeutliche Wabenstruktur (Tillmann und Meinecke, 1980) oder Mosaik (Couto und Hughes, 1984) dar, weil der Zytoplasmasaum um den Kern lediglich sehr schmal ist (Tillmann und Meinecke, 1980). Die beschriebene Wabenstruktur ist besonders bei jungen Zuchtstuten und Maidenstuten zu erkennen (Brook, 1985).

Im zytologischen Ausstrich können sich auch Stromazellen befinden. Sie sind durch einen elliptischen Kern und stark gefärbtes Chromatin charakterisiert. Die Kerne dieses Zelltyps können sich hinsichtlich ihrer Aktivität unterscheiden. Während der sekretorischen Aktivität ist das Chromatin spärlich, weist Chromozentren auf und die Kerne haben ein uniformes Erscheinungsbild. Im Zuge der Proliferationsphase des Endometriums sind die Zellkerne kompakt in dichten



Zellverbänden gelagert (Tillmann und Meinecke, 1980).

Die Endometriumzellen erfahren morphologische Änderungen, die jahreszeitlich- und zyklusbedingt sein können (Couto und Hughes, 1984; Brook, 1985; Freeman et al., 1986; Roszel und Freeman, 1988). Neben diesen physiologischen Veränderungen lassen sich ebenfalls degenerative Prozesse der Zellen im Ausstrich beobachten (Couto und Hughes, 1984; Brook, 1993; Dascanio, 2003).

Eine Hypersegmentation des Zellkerns, Veränderungen der Zellmembran, intrazelluläre Vakuolenbildung, Einschlüsse, eine schlechte Anfärbbarkeit des Zytoplasmas und Anschwellen der Zelle sind Anzeichen für degenerative Prozesse (Dascanio et al., 1997). Eine verspätete oder fehlerhafte Fixation wird als Hauptgrund für Degenerationserscheinungen angesehen (Couto und Hughes, 1984; Dascanio et al., 1997). Während des Entnahmeproganges und durch unvorsichtiges Aufarbeiten des entnommenen Probenmaterials können mechanische Schäden an den Zellen verursacht werden, welche ebenfalls zu Degenerationserscheinungen führen können (Couto und Hughes, 1984). Auch chronische Entzündungsprozesse verursachen degenerative Erscheinungen an den Endometriumzellen (Dascanio et al., 1997). Solomon et al. (1972) kamen zu dem Schluss, dass degenerative Veränderungen der Epithelzellen vermehrt bei Stuten mit einer verminderten Fertilität auftreten. Dieser Zusammenhang konnte von Brook et al. (1993) nicht bestätigt werden.

Schuppige und squamöse Epithelzellen kommen selten in Ausstrich vor und sind als eine cervikale oder vaginale Verunreinigung der uterinen Probe anzusehen. Dies kommt vor allem bei nicht sachgemäßen Probeentnahmen, bei Stuten mit intrauterinen Urinansammlungen (Couto und Hughes, 1984; Brook, 1985; Roszel und Freeman, 1988) und kurz nach der Geburt vor (Brook, 1985).

Knudsen (1964) hat als erster die zyklusabhängigen Veränderungen der Endometriumzellen in der exfoliativen Endometriumszytologie untersucht. In seiner Untersuchung maß er der Form der Zellkerne eine große Bedeutung zu.

Während des Anöstrus sind die Zellkerne klein, rund und schlecht anfärbbar. Die Zellen sind alle von gleicher Form und das Zytoplasma lässt sich ebenfalls schlecht anfärben.

Die Gestalt der Zellkerne und des Zytoplasmas entsprechen im Diöstrus dem des Anöstrus und die Zellen sind in Gruppen angeordnet.

Zu Beginn des Proöstrus haben die Zellkerne eine ovale Form, die im weiteren Verlauf dieses Zyklusabschnittes eine runde Gestalt annimmt. Die Zellen haben eine zylindrische Form und es ist mehr Zytoplasma vorhanden.

In der Rosse nimmt die Größe der Zellkerne zunächst zu, sie befinden sich am Rand der Zelle und

weisen eine runde Form auf. Im weiteren Verlauf schrumpfen bei vielen Zellen die Kerne und das Zytoplasma ist kaum sichtbar.

Die Gestalt der Endometriumzellen ist während der Fohlenrosse sehr vielfältig und eine große Mitoserate ist erkennbar.

Freeman et al. (1986) kamen zu dem Schluss, dass eine exakte Zyklusdiagnostik mit Hilfe der exfoliativen Endometriumszytologie nicht möglich ist. Jedoch gelang den Autoren der Nachweis von vier jahreszeitlichen Mustern, die dem jeweiligen saisonalen Reproduktionsstatus entsprechen. Das inaktive Zellmuster stimmt mit dem Winteranöstrus, das Frühlingszellmuster mit dem Übergang vom Winteranöstrus in die physiologische Zuchtsaison, das aktive Zellmuster mit der physiologischen Zuchtsaison und das Herbstübergangszellmuster mit dem Übergang der physiologischen Zuchtsaison in den Winteranöstrus überein (Roszel und Freeman, 1988).

Im Winteranöstrus sind die Endometriumzellen in Gruppen angeordnet, weisen eine abgeflachte bis isoprismatische (Brook, 1985, Liu, 1988, 1988, Roszel und Freeman, 1988; Dascanio, 2003) Form auf und können zytoplasmatische Granula aufweisen, die um den Zellkern angeordnet sind (Couto und Hughes, 1984; Roszel und Freeman, 1988). Ansonsten ist das Zytoplasma homogen (Brook, 1985) und der Zellkern kann hypochromatisch wirken, also ohne Chromatinpünktchen (Freeman et al., 1986). Die inaktive Phase kann auch bei sexuell unreifen und bei ovarioektomierten Stuten beobachtet werden (Freeman et al., 1986).

In der inaktiven Phase können die Zellkerne "nackt" erscheinen, da oftmals kaum Zytoplasma erkennbar ist (Freeman et al., 1986). Jedoch kann können diese "nackten" Kerne auch Artefakte sein, die durch eine mangelhafte Fixation oder Färbung verursacht werden kann (Couto und Hughes, 1984; Dascanio, 2003).

Während des Übergangs von Winteranöstrus in den aktiven Status des Endometriums gibt es verschiedene Veränderungen im Ausstrich. Zu Beginn des Frühlingsübergangsmusters können Apoptosevorgänge in Form von "*apoptotic bodies*" nachgewiesen werden, die eine Entzündungsreaktion, die von Makrophagen dominiert wird, zur Folge hat (Roszel und Freeman, 1988). Im weiteren Verlauf nimmt die Zahl der "*apoptotic bodies*" kontinuierlich ab und die Endometriumzellen verändern ihre Form von iso- zu hochprismatisch (Roszel und Freeman, 1988).

Das aktive Zellmuster liegt während der physiologischen Zuchtsaison vor und ist charakterisiert durch hochprismatische Endometriumzellen, deren Kerne basal angeordnet sind und mehrheitlich keine Zilien aufweisen (Freeman et al., 1986). Zellen, die nicht mit Zilien ausgestattet sind, weisen intrazelluläre Vakuolen auf (Roszel und Freeman, 1988) und das Zytoplasma wirkt schaumig, was auf eine metabolische und sekretorische Aktivität schließen lässt (Freeman et al., 1986). Die Zellen

können von Schleim umgeben sein (Freeman et al., 1986; Brook, 1993), weisen in der aktiven Phase eine säulenförmige Anordnung auf (Couto und Hughes, 1984; Freeman et al., 1986; Brook, 1993) und können einzeln oder in lockeren Gruppen angeordnet sein (Freeman et al., 1986). Die Darstellung des Zellbilds kann mit Hilfe der Uterus-Flush-Technik verbessert werden, da bei diesem Entnahmesystem die Zellen im Ausstrich nicht von Schleim umgeben sind (Brook, 1993). Die Zellkerne stellen sich basophil und oval mit punktförmigen Chromatineinlagerungen dar (Freeman et al., 1986).

Hochprismatische Endometriumzellen, die keine Zilien aufweisen, sind der dominante Zelltyp im Herbstübergangsmuster. Außerdem sind die Zellen stark in die Länge gezogen und weisen pyknotische Zellkerne auf (Roszel und Freeman, 1988). Diese länglichen und schlanken Zellen, die sich orange anfärben, sind vor allem zu Beginn der Übergangsphase vom aktiven Zellmuster in den Winteranöstrus zu finden. Die Minderheit der Zellen ist jedoch von kubischer Form mit einem hypochromatischen Kern und homogenen Zytoplasma. Dieses Zellverhältnis kehrt sich im weiteren Verlauf um, bis zu Beginn des Winteranöstrus die Mehrheit der Zellen eine kubische Form mit einem hypochromatischen Kern und homogenen Zytoplasma aufweisen (Freeman et al., 1986).

Endometriumzellen mit Zilien kommen vor allem im Diöstrus vor (Samuel et al., 1979; Keenan et al., 1991; Dascanio, 2003). Brook (1993) und Dascanio (2003) konnten diesen Zelltyp auch im Zellausstrich nachweisen. Studien haben gezeigt, dass durch eine Verkürzung des Diöstrus und durch eine Prostaglandin  $F_{2\alpha}$ -Applikation vermehrt Endometriumzellen mit Zilien in der nachfolgenden Rosse zu finden sind (Couto und Hughes, 1984; Dascanio, 2003). Jedoch kann der Zilienbesatz während der Probenentnahme und Aufbereitung verloren gehen (Tillmann und Meinecke, 1980; Dascanio, 2003).

Es ist nicht möglich mit Hilfe des Zellbildes und diesen Beschreibungen eine exakte Zyklusdiagnostik durchzuführen (Dascanio, 2003).

Die Anzahl von Endometriumzellen pro Gesichtsfeld im Ausstrich ist nicht mit allen Entnahmesystemen gleich. Neuberg (2009) hat den CytologyBrush<sup>®</sup> für Stuten (Fa. Minitüb, Tiefenbach), den Knudsen-Katheter und den Uteruskulturtupfer für Pferde (Fa. Minitüb, Tiefenbach) hinsichtlich der Anzahl von Endometriumzellen pro Gesichtsfeld miteinander verglichen. Er konnte zeigen, dass der CytologyBrush<sup>®</sup> signifikant mehr Endometriumzellen pro Gesichtsfeld nachweisen kann als der Knudsen-Katheter und der Uteruskulturtupfer.

### 2. 3. 3 Erythrozyten

In der exfoliativen Endometriumszytologie werden regelmäßig rote Blutkörperchen detektiert (Couto und Hughes, 1984). Sie sind kleiner als neutrophile Granulozyten und weisen eine zentrale Aufhellung auf (Dascanio, 2003). Besonders post partum sind Erythrozyten im zytologischen Ausstrich nachweisbar. Ihre Anzahl nimmt bis zur Fohlenrosse kontinuierlich ab, wobei dieser Zelltyp bei einer verlängerten Involutionsdauer vermehrt nachweisbar ist. Es konnte eine positive Korrelation zwischen der Anwesenheit von roten Blutkörperchen und der Anzahl von neutrophilen Granulozyten in der exfoliativen Endometriumszytologie gezeigt werden (Brook, 1985; Saltiel et al., 1987). Dies deckt sich mit der Erkenntnis, dass rote Blutkörperchen gehäuft während einer akuten Endometritis im Ausstrich auftreten (Digby, 1978; Couto und Hughes, 1984; Brook, 1985). In der Rosse kann dieser Zelltyp ebenfalls nachgewiesen werden, da die physiologische Hyperämie des Endometriums zu einer zunehmenden kapillären Instabilität führt. Dadurch können Erythrozyten gehäuft aus dem Gefäß in das Gewebe übertreten und in der zytologischen Untersuchung nachgewiesen werden (Couto und Hughes, 1984). Oftmals sind sie Folge eines intrauterinen Traumas (Digby, 1978), z. B. durch eine Biopsieentnahme (Brook, 1993). Auf die Anwesenheit von Erythrozyten im zytologischen Ausstrich sollte geachtet werden, da große Mengen an Blut spermienfeindlich sein können. Dies kann das Befruchtungsergebnis negativ beeinflussen (LaCour, 1985). Der Nachweis dieses Zelltyps ist abhängig vom Entnahmesystem. So konnte Neuberg (2009) zeigen, dass der CytologyBrush® signifikant häufiger Erythrozyten detektieren kann als der Uteruskulturtupfer für Pferde (Fa. Minitüb, Tiefenbach).

### 2. 3. 4 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind der überwiegende Zelltyp, der während der Endometritis im Ausstrich nachgewiesen wird (LeBlanc, 2011). Somit kann mit Hilfe der Präsenz von neutrophilen Granulozyten eine Entzündung der Gebärmutterschleimhaut sicher festgestellt werden (Walter und Wehrend, 2007), da bei jeder extravasalen Infiltration von Entzündungszellen in das Endometrium jene Zellen im Ausstrich sicher nachgewiesen werden können (Tillmann und Meinecke, 1980).

Auch nach einer Infusion von biologischen oder chemischen Stoffen in den Uterus können neutrophile Granulozyten in der exfoliativen Endometriumszytologie nachgewiesen werden (Williamson et al., 1983; Pycock et al., 1988; Kotilainen et al., 1994). Der Grad der Entzündung kann durch die Dichte der neutrophilen Granulozyten abgeschätzt werden (Tillmann und Meinecke, 1980).

Die Diagnosestellung im Rahmen der Differentialzytologie beruht in erster Linie auf der

Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten (Tillmann und Meinecke, 1980). Um in diesem Zusammenhang eine sichere Diagnose stellen zu können, ist der Nachweis vieler neutrophiler Granulozyten im Ausstrich notwendig (Knudsen, 1964; Roszel und Freeman, 1988). Eine geringe Anzahl an Entzündungszellen im Ausstrich kann die Beurteilung erschweren (Brook, 1993).

In der Literatur werden viele Richtlinien für die Interpretation des Nachweises neutrophiler Granulozyten in der exfoliativen Endometriumszytologie beschrieben, um eine Endometritis zu diagnostizieren (Tabelle 3).

Tabelle 3: Quantitative Schätzung der neutrophilen Granulozyten in der Endometriumszytologie, (GF = Gesichtsfeld; PMN = neutrophile Granulozyten) modifiziert nach Brook (1993)

Autor	Methode der Quantifizierung				Vergrößerung
Knudsen (1964)	Positiv bei > 1 PMN pro GF				240fach
Lauer (1977)	Grad 1	+/-	1 bis 5	PMN pro 10 GF	400fach
	Grad 2	+	1	PMN pro 10 GF	
	Grad 3	++	2 bis 10	PMN pro 10 GF	
	Grad 4	+++	10 bis 30	PMN pro 10 GF	
	Grad 5	++++	> 30	PMN pro 10 GF	
Wingfield Digby (1978)	Positiv bei ≥ 1 PMN pro GF				400fach
Couto und Hughes (1985)	-	0 bis 3 %		PMN	400fach
	+	3 bis 10 %		PMN	
	++	10 bis 15 %		PMN	
	+++	15 bis 30 %		PMN	
	++++	30 bis 50 %		PMN	
	+++++	50 bis 75 %		PMN	
	++++++	> 75 %		PMN	
Brook (1985)	Negativ	0		PMN pro 10 GF	400fach
	Zweifelhaft	1 bis 5		PMN pro 10 GF	
	Positiv	5		PMN pro 10 GF	
LaCour und Sprinkle (1985)	Kategorie 0	mehrheitlich EZ sehr wenig Zelltrümmer			1000fach
	Kategorie 1	EZ in Klumpen angeordnet etwas Zelltrümmer und Schleim vereinzelt mononukleäre Zellen			

<div> <div>Kategorie 2</div> <div>Abnehmende Anzahl und Größe von EZ</div> <div>Vermehrt Zelltrümmer</div> <div>weniger als 1 PMN pro GF</div> </div> <div> <div>Kategorie 3</div> <div>Vereinzelt intakte EZ</div> <div>Viel Zelltrümmer, Erythrozyten, Makrophagen</div> <div>2 – 3 PMN pro GF</div> </div> <div> <div>Kategorie 4</div> <div>Zelltrümmer, Erythrozyten</div> <div>&gt; 3 PMN pro GF</div> </div> <div> <div>Kategorie 5</div> <div>Ausschließlich PMN, z.T. degeneriert</div> </div>			
Ball et al. (1988)	Positiv bei > 2 % PMN		400fach
Purswell et al. (1989)	Positiv bei $\geq 1$ PMN pro GF		400fach
Ricketts und Mackintosh (1987)	-	0 %	PMN
	+/-	< 0,5 %	PMN
	+	0,5 bis 5 %	PMN
	++	5 bis 30 %	PMN
	+++	> 30 %	PMN
Dascanio (2003)	Positiv	> 5	PMN pro 10 GF
		> 1 bis 2	PMN pro 5 GF
		< 40:1	Verhältnis von EZ zu PMN
Card (2005)	Negativ	< 5 %	PMN
	Mild	5 bis 15 %	PMN
	Moderat	15 bis 30 %	PMN
	Schwer	> 30 %	PMN

Um den Ausstrich zu beurteilen, wird die Anzahl der neutrophilen Granulozyten pro Gesichtsfeld ausgezählt (Knudsen, 1964; Tillmann und Lauer, 1977; Purswell et al., 1989; Dascanio, 2003) und kann mit der Anzahl der restlichen Zellen ins Verhältnis gesetzt werden (Couto und Hughes, 1985; Ricketts und Mackintosh, 1987; Ball et al., 1988; Card, 2005).

Hinsichtlich der Interpretation eines geringgradigen Nachweises neutrophiler Granulozyten im Ausstrich bei geschlechtsgesunden Stuten gibt es verschiedene Angaben.

Wingfield Digby et al. (1982) sind der Meinung, dass während der Rosse keine neutrophilen Granulozyten in der exfoliativen Endometriumszytologie nachgewiesen werden können. Lediglich während des ersten Östrus nach der Winterazyklie sind neutrophile Granulozyten im Ausstrich sichtbar (Wingfield Digby und Ricketts, 1982). Im Gegensatz dazu war es Kotilainen et al. (1994) nicht möglich mit der Low-Volume-Uterus-Flush-Technik neutrophile Granulozyten in der Rosse nachzuweisen.

Jedoch beschreiben einige Autoren eine geringgradige Infiltration von neutrophilen Granulozyten im Uterus genitalgesunder Stuten als physiologisch (Knudsen, 1964; Brook, 1985). Die Angaben zum Gehalt dieses Zelltyps variieren zwischen 0,66 % (Aguilar et al., 2006) und 2 % neutrophile Granulozyten im Ausstrich bis zu vier Tage nach der Ovulation (Card, 2005).

Eine leichte physiologische Zunahme der neutrophilen Granulozyten kommt ebenfalls während des vierten und siebten Tages nach einem natürlichem Deckakt vor. Diese Erhöhung kann durch mechanische Verletzungen des Endometriums (Couto und Hughes, 1984), Bakterien, die durch den Deckakt übertragen werden, und durch Spermien verursacht werden (Kotilainen et al., 1994).

Im Zuge einer "*post breeding induced endometritis*" kommt es bereits wenige Stunden nach der Besamung zu einer Immigration von neutrophilen Granulozyten in das uterine Lumen (Kotilainen et al., 1994; Troedsson et al., 1995). Diese Reaktion kann als normale Reaktion angesehen werden, um Spermien aus dem weiblichen Reproduktionstrakt zu entfernen (Troedsson et al., 1998; Troedsson, 1999). In vitro Studien haben gezeigt, dass Spermatozoen über eine Aktivierung der Komplementkaskade eine Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten verursachen können (Troedsson et al., 1995; Rozeboom et al., 2000), welche auch im equinen Uterus beobachtet werden kann (Watson et al., 1987). Die aktivierten neutrophilen Granulozyten binden an die Spermatozoen und phagozytieren diese schließlich (Alghamdi et al., 2004). Innerhalb von 24 bis 36 Stunden nach der Besamung sollten sämtliche Entzündungsanzeichen verschwunden sein (Katila, 1995).

Bei einer bakteriell bedingten Endometritis sind neutrophile Granulozyten der dominierende Zelltyp (Knudsen, 1964; Digby, 1978; Wingfield Digby und Ricketts, 1982), deshalb kann mit der zytologischen Untersuchung die Infektiosität der parallel nachgewiesenen Keime sehr gut interpretiert werden (Tillmann und Meinecke, 1980).

Erfolgt lediglich ein Keimnachweis und es werden keine Entzündungszellen im Ausstrich detektiert, so handelt es sich entweder um eine Kontamination während des Entnahmeporganges (Dascanio et al., 1997) oder opportunistische Keimbesiedelung (Witherspoon et al., 1972). Bei einer opportunistischen Keimbesiedelung der Genitalschleimhäute kann davon ausgegangen werden, dass deren Funktion nicht beeinträchtigt wird (Tillmann und Meinecke, 1980).

Ein Nachweis von neutrophilen Granulozyten im Ausstrich mit gleichzeitig negativem bakteriologischem Befund kann durch ein falsch-negatives Ergebnis der mikrobiellen Untersuchung verursacht werden (Digby, 1978; Brook, 1985). Es gibt verschiedene Ursachen für solche Ergebnisse:

- Intrauterine Anwesenheit von antimikrobiellen Substanzen (Digby, 1978)
- Der mikrobielle Herd befindet sich zu weit cranial, um mit einer Uterustupferprobe nachgewiesen zu werden (Digby, 1978)
- Ein Fehler bei der in vitro Kultivierung (Digby, 1978)

Desweiteren kann ein bakteriologisch negativer Befund bei einem gleichzeitig positiven Resultat der zytologischen Untersuchung folgende Ursachen haben:

- Bis zum neunten Tag p. p. sind neutrophile Granulozyten im Ausstrich nachweisbar (Crickmann und Pugh, 1986)
- Bis zu 96 Stunden nach einer Besamung/Bedeckung können bis zu 5 % neutrophile Granulozyten im Ausstrich nachgewiesen werden und als unbedenklich angesehen werden (Card, 2005)
- Irritationen des Endometriums verursacht z. B. durch eine Pneumovagina (Digby, 1978)

Bei einer Endometritis sicca handelt es sich um eine chronische nicht-eitrige Endometritis. Sie stellt bei ca. 15 % der güstigen Stuten die Ursache für Fertilitätsstörungen dar. Sie kann ebenfalls ein negatives bakteriologisches und positives zytologisches Ergebnis aufweisen (Walter und Wehrend, 2007).

Eine Infektion mit pathogenen Keimen verursacht fast immer eine intrauterine Neutrophilie, die auch im Zellausstrich nachweisbar ist (LaCour, 1985). Eine Korrelation zwischen positiven bakteriologischen und zytologischen Befund wurde in vielen Studien untersucht und liegt zwischen 64 % (Riddle et al., 2007) und 80 % (Knudsen, 1964; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; LaCour, 1985; Reinemund, 1988).

Lassen sich in der exfoliativen Endometriumszytologie überwiegend neutrophile Granulozyten, bei gleichzeitigem Nachweis von fakultativ pathogenen Keimen, nachweisen, so gilt dies als sicherer Hinweis für eine schwere Endometritis (Brook, 1993).

Bei genitalgesunden Stuten lassen sich auch apathogene Bakterien im Uterus nachweisen (Klein et al., 2009), deshalb ist für manche Autoren die zytologische Untersuchung des Endometriums besser geeignet, um eine Stute zur Besamung frei zu geben (Knudsen, 1964; Dascanio et al., 1997). Als



genitalgesund werden Stuten gewertet, die sowohl in der zytologischen als auch in der bakteriologischen Untersuchung als unbedenklich eingestuft werden (Brook, 1985).

Auf den Schweregrad und die Art der Entzündung kann mit Hilfe der Morphologie der neutrophilen Granulozyten geschlossen werden. Bei septischen Entzündungen des Endometriums, die durch bakterielle Erreger verursacht werden, zeigen sich an den Kernen karyolytische, karyorrhektische und pyknotische Veränderungen. Im Gegensatz dazu lassen sich bei nicht-infektiösen Entzündungen, welche durch Besamungen oder Bedeckungen verursacht werden können, intakte hypersegmentierte neutrophile Granulozyten finden (LaCour, 1985).

### 2. 3. 5 Sonstige Zelltypen

Eosinophile Granulozyten lassen sich nur selten im Endometrium nachweisen. Sie haben in der Diff-Quick-Färbung einen gelappten Kern und beinhalten runde, pinke intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen (LeBlanc, 2011). Sie können im Puerperium (Katila, 1988) und als Folge eines Lufteinstromes in den equinen Genitaltrakt detektiert werden (Slusher et al., 1984). Während des Puerperiums gelang es Katila et al. (1988) diesen Zelltyp in der Lamina propria nachzuweisen. Eine Pneumovagina, die einen Pneumouterus verursachen kann, wird ebenfalls mit dem Auftreten von eosinophilen Granulozyten in Verbindung gebracht. Dieser Zusammenhang wurde experimentell bestätigt, indem künstlich Luft in den Uterus von Stuten insuffliert wurde und ein verstärktes Auswandern von eosinophilen Granulozyten in das uterine Gewebe beobachtet werden konnte (Slusher et al., 1984). Desweiteren können eosinophile Granulozyten als eine allergische Reaktion des Uterus auf eine intrauterine Penicillin- oder Ampicillinapplikation beobachtet werden (LeBlanc, 2011). In der equinen Zervix ist dieser Zelltyp Bestandteil des lokalen Immunsystems während des Diöstrus, wobei die Konzentration von eosinophilen Granulozyten vom Ostium uteri externum zum Ostium uteri internum abnimmt (Wehrend et al., 2005).

Lymphozyten sind lediglich unregelmäßig im zytologischen Ausstrich zu detektieren (Digby, 1978). Sie sind kleiner als neutrophile Granulozyten, jedoch größer als Erythrozyten und weisen ein bläulich schimmerndes Zytoplasma auf (Dascanio, 2003). Die Differenzierung zwischen unreifen neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten kann schwierig sein (Brook, 1993). Bei chronischen Endometritiden und einer Stauung der Lymphgefäße des Endometrium kann dieser Zelltyp gehäuft im Ausstrich auftreten (Couto und Hughes, 1984; Dascanio, 2003).

Makrophagen sind ebenfalls selten in der exfoliativen Endometriumszytologie zu finden. Sie sind größer als neutrophile Granulozyten und weisen einen bohnenförmigen Kern auf. Das Zytoplasma ist bläulich, reichlich vorhanden und kann Vakuolen enthalten (LaCour, 1985; Dascanio, 2003). Sie

treten vermehrt in der frühen post partalen Phase (Brook, 1985; LaCour, 1985) in Kombination mit Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten, auf (Brook, 1985). Ebenfalls in Kombination mit Plasmazellen treten sie während chronischen oder am Ende akuter Entzündungen im Zellausstrich auf (Dascanio et al., 1997).

Plasmazellen werden regelmäßig detektiert, können jedoch nicht mit klinischen Problemen in Verbindung gebracht werden (LaCour, 1985).

### 2. 3. 6 Bakterien, Pilze und Kristalle

Neben zellulären Bestandteilen gelingt gelegentlich auch der Nachweis von Kalziumkarbonatkristallen im zytologischen Ausstrich. Dies kann bei Stuten beobachtet werden, die eine Neigung zu intrauterinen Urinansammlungen haben (Roszel und Freeman, 1988). Aus dem einmaligen Nachweis solcher Kristalle muss nicht sofort auf eine Erkrankung des Urogenitaltraktes geschlossen werden, da dies ein vorübergehender Zustand sein kann. Jedoch kann mit einem wiederholten Nachweis solcher Kristalle im Zellausstrich, dem Auftreten von squamösen Endometriumzellen und dem Auftreten von klinischen Symptomen auf eine Problematik dieses Organsystem geschlossen werden (Brook, 1993).

Mit Hilfe der exfoliativen Endometriumszytologie sind selbst bei einem positiven Befund der mikrobiologischen Untersuchung Bakterien nur selten zu finden (Brook, 1985; LeBlanc, 2011). Durch eine Gram-Färbung sind diese besser zu erkennen (LeBlanc, 2011) und der Einsatz einer antimikrobiellen Therapie kann bis zum Vorliegen des Resistenztests optimiert werden (Shin et al., 1979; Crickman und Pugh, 1986). Der zytologische Ausstrich kann ein wichtiges Instrument für den Nachweis einer Pilzinfektion sein, da manche Pilzarten nur schlecht unter normalen Laborbedingungen kultiviert werden können. Bei Präparaten, die viel Zelldetritus enthalten, können die Pilzhyphen jedoch schnell übersehen werden (LeBlanc, 2011). Ein positiver Bakterien- oder Pilzbefund in der zytologischen Untersuchung sollte immer kritisch gesehen werden, da Färbelösungen ebenfalls Keime enthalten können und somit der Ausstrich falsch interpretiert werden kann (Couto und Hughes, 1984).

Mit der standardmäßigen Diff-Quick-Färbung sind Hefen ebenfalls gut darstellbar. Sie sind oft mit dem Auftreten von neutrophilen Granulozyten vergesellschaftet. Zumeist haben die Sporen eine runde Form, sind von schwarzer oder dunkelblauer Farbe und haben eine golden schimmernde Kapsel. Sie können in Größe, Form und Farbe variieren (LeBlanc, 2011).

### 3 Material und Methode

#### 3.1 Probanden

Die Untersuchungen fanden in der Zuchtsaison 2011 von Ende April bis Ende Juni und in der Zuchtsaison 2012 von Anfang März bis Ende Juni statt.

Alle Stuten wurden zur instrumentellen Besamung auf einer privaten EU-Besamungsstation in Bayern aufgestellt. An der Studie nahmen 2011 50 und 2012 75 Stuten teil, von denen einige mehrmals beprobt wurden, wenn sie umgerosst hatten. Dadurch ergab sich für das Jahr 2011 eine Probenanzahl von 57 und 2012 von 89 und eine Gesamtprobenzahl von 146. Anamnestisch wurden die Rasse, das Alter, die Anzahl der bisher geborenen Fohlen und das Datum der letzten Geburt der Probanden erhoben. Die Probenentnahmen, deren Ergebnisse in der Dissertation weitergehend ausgewertet wurden, waren Bestandteil der gynäkologischen Untersuchung vor der Besamung. Einem Teil der Stuten wurde eine Blutprobe entnommen um eine genaue Zyklusdiagnostik durchführen zu können.

#### 3.2 Versuche

##### 3.2.1 Vergleich zweier Zytologie-Entnahmesysteme

Die Entnahme des Materials für die exfoliative Endometriumszytologie erfolgte entweder mit einem Uteruskulturtupfer für Stuten (Fa. Minitüb, Tiefenbach) oder mit Hilfe des CytologyBrush<sup>®</sup> für Stuten (Fa. Minitüb, Tiefenbach). Der Uteruskulturtupfer wurde in der Decksaison 2011 und das CytologyBrush<sup>®</sup>-System wurde während der Decksaison 2012 verwendet.

In diesem Versuchsabschnitt wurden insgesamt 146 Proben entnommen, die sich folgendermaßen verteilten:

- Gruppe 1: Uteruskulturtupfer  
n = 57
- Gruppe 2: CytologyBrush<sup>®</sup>  
n = 89

### 3. 2. 2 Einfluss der hormonellen Situation auf das Auftreten von Endometriumzellen und Erythrozyten im Ausstrich

Sämtlichen Stuten, denen ein zytologischer Abstrich mit CytologyBrush® entnommen wurde, wurden diesem Versuch zugeordnet.

Gleichzeitig wurden den Stuten jeweils ca. zwölf Milliliter venöses Blut aus der Vena jugularis externa zur Bestimmung der Östradiol-17-β- und der Progesteronkonzentration entnommen.

Es wurden insgesamt 76 Stuten beprobt.

### 3. 3 Untersuchungsverfahren

#### 3. 3. 1 Gynäkologische Untersuchung

Zunächst wurde von allen Tieren in der Anamnese der Reproduktionsstatus erhoben und diese dann einer gynäkologischen Untersuchung unterzogen. Hierbei wurde eine rektale palpatorische und ultrasonographische (Magic 5000 Eickemeyer, 5,0 MHz Linearschallkopf) Untersuchung des Uterus und der Ovarien durchgeführt, wofür Einmalrektalhandschuhe (WDT, Garbsen) und Gleitgel (WDT, Garbsen) verwendet wurden. Die erfassten Parameter sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Erfasste Parameter der gynäkologischen Untersuchung

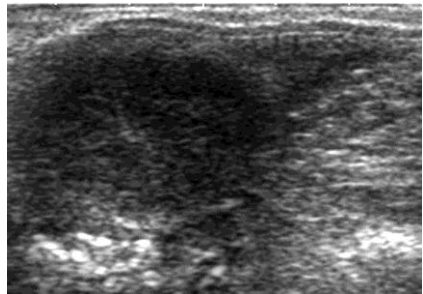
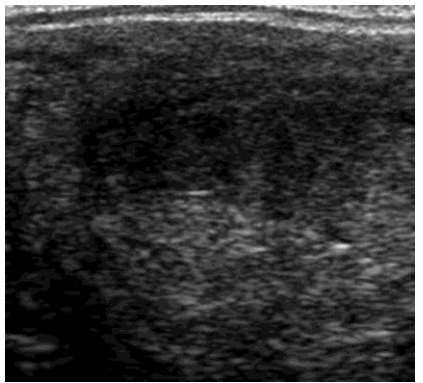
<b>Gynäkologische Untersuchung</b>	<b>Erfasste Parameter</b>
Anamnese	<p>Alter</p> <p>Anzahl der Fohlen</p> <p>Datum der Geburt im Jahr der Beprobung</p> <p>Jahr der letzten Geburt</p> <p>Ergebnis vorheriger Trächtigkeitsuntersuchung</p>
Äußerlich sichtbarer Vaginalausfluß	<p>Vorhanden</p> <p>Nicht vorhanden</p>

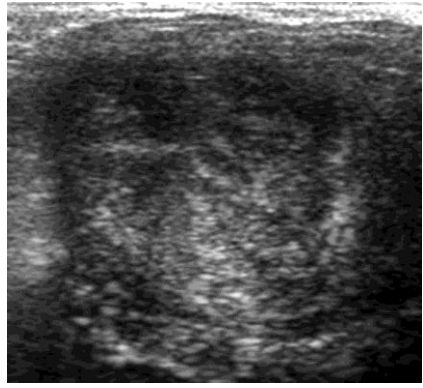
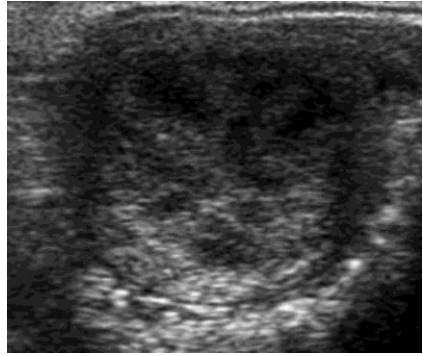


## Material und Methode

Uterus	Flüssigkeitsansammlungen Uteruszyten Uterus-Ödem Lage Tonisierung Symmetrie
Ovar	Größe des dominanten Tertiärfollikels in cm

Die Stuten wurden anhand der Resultate der rektalen palpatorischen und ultrasonographischen Untersuchung in die verschiedenen Zyklusstadien Fohlenrosse, Östrus und Diöstrus eingeteilt. Stuten wurden als östrisch gewertet, wenn sie einen Follikel von über drei Zentimeter im Diameter und eine Ödematisierung des Uterus vorlag (Aurich, 2009). Für die Einteilung des Uterusödems wurde die Skala nach Samper (2010) von 0 bis 5 verwendet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Kategorisierung des Uterusödems nach Samper (2010)

Grad	Beschreibung	Abbildung
0	Homogene Echotextur	
1	Deutliche Heterogenität des Gewebes	

2	Deutliche Falten, die nicht über den gesamten Uterus ausgedehnt sind	
3	Radspeichen sind über den gesamten Uterus ausgedehnt	
4	Prominente Falten mit einer erhöhten Wanddicke und Hyperechogenität der Grenzbereiche	
5	Endometriale Falten mit verdickten Wänden, hyperechogenen Grenzflächen und hypoechogenen Zentren und freie Flüssigkeit im Corpus uteri	

Flüssigkeitsansammlungen im Cavum uteri wurden in zwei Grade unterteilt. Hierbei wurden Ansammlungen von weniger als zwei Zentimeter als geringgradig und von über zwei Zentimeter als hochgradig klassifiziert (Brinsko et al., 2003).

### 3. 3. 2 Trächtigkeitsuntersuchung

Die Trächtigkeitsuntersuchung erfolgte zwischen dem 16. - 20. Tag nach der Besamung entweder auf der Besamungsstation oder ambulant vor Ort. In einzelnen Fällen wurde das Ergebnis telefonisch beim Besitzer erfragt, falls die Untersuchung durch den Haustierarzt durchgeführt wurde.

Es wurde zwischen einer ersten, zweiten und dritten Trächtigkeitsuntersuchung unterschieden. Die Untersuchungen entsprechen jeweils der ersten Trächtigkeitsuntersuchung nach der ersten oder zweiten oder dritten Bedeckung in der jeweiligen Decksaison.

Das Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung wurde als positiv gewertet, wenn ultrasonographisch (Magic 5000 Eickemeyer, 5,0 MHz Linearschallkopf) eine hypoechogene Fruchtanlage und eine Kontraktilität der Gebärmutter festgestellt werden konnte.

### 3. 3. 3 Entnahmetechnik der zytologischen Untersuchung

Das äußere Genitale wurde vor jeder Probenentnahme zunächst trocken mit Zellstoff, dann mit einer hautverträglichen Desinfektionslösung (Primasept<sup>®</sup>, WDT Garbsen), danach nochmals trocken gereinigt und der Schweif eingebunden. Anschließend wurde ein steriles Scheidenspekulum nach Polansky und wenn nötig eine sterile Zervixfazzange nach Götze zur sterilen Probenentnahme verwendet.

Bei den beiden Entnahmesystemen handelte es sich um den Uteruskulturtupfer für Pferde (Fa. Minitüb, Tiefenbach, Abbildung 1) und den CytologyBrush<sup>®</sup> (Fa. Minitüb, Tiefenbach, Abbildung 2). Beide Systeme sind doppelt geschützt, steril, einzeln verpackt und zum einmaligen Gebrauch.

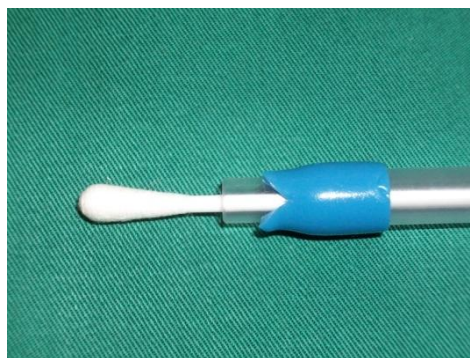


Abbildung 1: Uteruskulturtupfer für Pferde (Fa. Minitüb, Tiefenbach)

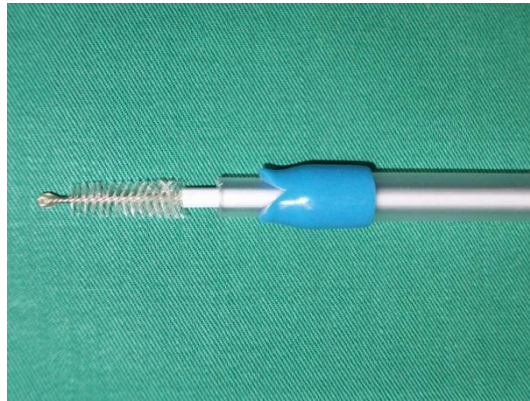


Abbildung 2: CytologyBrush<sup>®</sup> (Fa. Minitüb, Tiefenbach)

Der Uteruskulturtupfer für Pferde besteht aus einer äußeren, einer inneren Hülle (doppelt geschütztes System) und einem Wattetupfer zur Probenentnahme. Das Tupfersystem wurde unter Sichtkontrolle und ohne die Vagina zu berühren durch den Zervixkanal in die Gebärmutter eingeführt. Danach wurde die innere Hülle durch die blaue Kappe der äußeren Hülle gedrückt und der Wattetupfer in das Cavum uteri verbracht.

Durch vorsichtiges Drehen am Stab, an dessen Ende der Tupfer befestigt war, wurden Zellen aus der Gebärmutter aufgenommen. Danach war darauf zu achten, den Wattetupfer wieder in die innere Schutzhülle und diese wiederum in die äußere Schutzhülle zu ziehen, um eine Kontamination der Probe zu verhindern, bevor man das System aus der Gebärmutter entfernte. Nach der Entnahme aus dem Geschlechtstrakt wurden beide Hüllen entfernt und der Wattetupfer mit sanftem Druck in nicht überlappenden horizontalen Bahnen auf einem Objektträger (76 x 26 mm, VWR, Darmstadt) ausgerollt.

Der CytologyBrush<sup>®</sup> besteht neben einem doppelt geschütztem System aus einer kleinen Bürste, die durch sanfte Drehbewegungen Zellen des Endometriums aufnimmt. Das Entnahmesystem wurde auf gleiche Weise wie der Uteruskulturtupfer in den Uterus eingebracht.

Anschließend wurde die innere Hülle bis zur ersten Markierung vorgeschoben. Dadurch wurde die Kappe der äußeren Hülle geöffnet und die Bürste konnte in die Gebärmutter vorgeschoben werden. Die Zellen wurden durch oben beschriebene Drehbewegungen des Stabes, an dessen Ende die Bürste angebracht war, aufgenommen.

Schließlich wurde die Bürste in die innere Hülle und diese wiederum in die äußere Hülle zurückgezogen und das System aus der Gebärmutter entfernt.

Der zytologische Ausstrich wurde auf gleiche Weise wie mit dem Uteruskulturtupfer angefertigt.



### 3. 3. 4 Besamungstechnik

Die Ovulation wurde bei allen Tieren, bei denen ein Uterusödem des Grades 4 und ein tertiärer Follikel mit 40 mm im Diameter vorlag, entweder mit 3000 IE humanen Choriongonadotropin (Ovogest<sup>®</sup> 1000 IE/ml, Fa. Intervet Unterschleißheim) oder 2,1 mg Deslorelin (Ovuplant<sup>®</sup>, Fa. Selectavet, Weyarn-Holzolling) ausgelöst. Die Insemination erfolgte nach der Ovulation.

Die Stuten wurden, wie bei der Entnahme der zytologischen Proben, vor der Samenübertragung fixiert, das äußere Genitale gereinigt und der Schweif eingebunden. Anschließend wurde ein steriles Spreizspekulum nach Polansky in die Vagina eingeführt und der Muttermund identifiziert. Die Portio vaginales wurde mit einer Zervixfasszange fixiert und die Besamungspipette (Fa. Minitüb, Tiefenbach) in den Uterus vorgeschoben und der Samen in den Uterus verbracht. Der Abstand zwischen Probenentnahme für die exfoliative Endometriumzytologie und der Ovulation wurde in Tagen angegeben.

### 3. 3. 5 Entnahmetechnik der Blutprobe

Vor jeder Blutentnahme wurde die Haut über der Punktionsstelle mit einem alkoholischen Desinfektionsmittel (Kodan<sup>®</sup> Forte Tinktur Forte, WDT Garbsen) desinfiziert. Zur Entnahme wurde das Blut in der Vene durch manuelle Kompression gestaut, die Vene mit einer sterilen Einmalkanüle (WDT, Garbsen) punktiert und ca. zwölf Milliliter Blut in ein Blutserumröhrchen (15 ml Serumröhrchen, Synlab Augsburg) gefüllt.

## 3. 4 Probenaufbereitung

### 3. 4. 1 Probenaufbereitung für die zytologische Untersuchung

Die angefertigten exfoliativen Endometriumszytologien wurden umgehend mit einem handelsüblichen Fixationsspray (Mercofix<sup>®</sup> Fixationsspray, Merck, Darmstadt) konserviert.

Die Proben wurden mit dem Hemacolor<sup>®</sup>-Färbeset (Merck, Darmstadt), das den anionischen Farbstoff Eosin und kationischen Farbstoff Thiazin enthält, fixiert und gefärbt. Durch eine Mischung der oben genannten Komponenten entsteht der sogenannte Romanowsky-Giemsa-Effekt, welcher die Kerne rot bis violett und die Granula der neutrophilen Granulozyten hellviolett erscheinen lässt.

Die Objektträger wurden jeweils sechsmal für die Dauer von einer Sekunde in das Behältnis jeder Lösung getaucht. Das weitere Vorgehen bestand darin, die Unterseite des Objektträgers vorsichtig

mit Leitungswasser abzuspülen, um überschüssige Färbelösung zu entfernen.

Abschließend wurden die gefärbten Präparate luftgetrocknet und mit Hilfe eines Eindeckmittels (Entellan<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt) ein Deckglas (24 x 50 mm, Fa. VWR<sup>®</sup>, Darmstadt) aufgeklebt.

### 3. 4. 2 Probenaufbereitung für die Bestimmung des hormonellen Status

Progesteron und Östrogen wurden im Blutserum bestimmt. Zum Absedimentieren der zellulären Blutbestandteile wurden die Blutproben vier Stunden senkrecht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Um das Blutserum zu gewinnen, wurden die Proben mit 4000 rpm (2000 g; r = 0,1 m) über die Dauer von 15 Minuten bei 20 °C zentrifugiert (LC 6 Plus<sup>®</sup>, Sarstedt, Nümbrecht).

Im Anschluss wurde der flüssige Überstand mit Hilfe einer sterilen Kanüle (WDT, Garbsen) und einer sterilen zehn Milliliter Einmalspritze (WDT, Garbsen) in ein frisches 15 ml Serumröhrchen (Synlab, Augsburg) abgefüllt. Bis zur Auswertung wurden die Proben bei - 20 ° C gelagert.

### 3. 5 Auswertung

#### 3. 5. 1 Lichtmikroskopische Auswertung der exfoliativen Endometriumszytologien

Die Auswertung der angefertigten Zytologien erfolgte mit Hilfe des Lichtmikroskopes CHK-G der Firma Olympus.

Zunächst wurde jeder Ausstrich bei 100facher Vergrößerung großflächig bezüglich der Zellverteilung und Zellmorphologie durchgemustert. Die Beurteilung der Zellmorphologie wurde wie folgt durchgeführt:

- Ausstrich auswertbar, < 50 % der Zellen deformiert
- Ausstrich nicht auswertbar, > 50 % der Zellen deformiert

Baumwollfäden, nicht differenzierbare Zellanhäufungen, Zellklumpen und einzelne, stark deformierte Zellen, die keinem speziellen Zelltyp zugeordnet werden konnten, wurden als Deformationen gewertet.

Abschließend wurden je Ausstrich zehn Gesichtsfelder bei 200facher Vergrößerung hinsichtlich folgender Parameter ausgezählt:

- Anzahl der Endometriumzellen
- Anzahl der Erythrozyten

- Anzahl der neutrophilen Granulozyten

Um eine repräsentative Untersuchung sicher zu stellen, führten starke Zelldeformationen und eine unzureichende Zellzahl im Ausstrich zu einem Ausschluss aus der Studie.

Ein Ausstrich wurde auf Grund von zu geringer Zellzahl von der Untersuchung ausgeschlossen, wenn bei 200facher Vergrößerung weniger als 30 Zellen (Endometriumzellen, Erythrozyten und neutrophile Granulozyten) in zehn Gesichtsfeldern ausgezählt werden konnten.

Der Abstand zwischen Entnahme des Probenmaterials für die exfoliative Endometriumszytologie und der letzten Geburt wurde in Tagen angegeben. Bei Maidenstuten wurde der Abstand als 0 Tage gewertet. Falls eine Stute seit mehr als einem Jahr kein Fohlen mehr geboren hatte wurde der Abstand auf 365 Tage festgelegt.

### 3. 5. 2 Auswertung der Blutserumproben

Die hormonelle Auswertung aller Blutserumproben erfolgte durch die Mitarbeiter des endokrinologischen Labors der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz. Mit Hilfe eines Radioimmunassay, der ein etabliertes Verfahren zur Bestimmung dieser Hormone darstellt, (Hoffmann et al., 1973; Hoffmann et al., 1992; Klein et al., 2003) wurden Progesteron und Östradiol-17- $\beta$  im Doppelansatz gemessen. Die untere Nachweisgrenze beträgt bei Progesteron 0,1 ng/ml (0,32 nmol/l) und 0,4 pg/ml (1,47 pmol/l) bei Östradiol-17- $\beta$ . Der Intraassayvariationskoeffizient betrug bei der Progesteronmessung 8,9 % und bei der Östradiol-17- $\beta$ -Bestimmung 17,1 %.

### 3. 6 Statistische Methoden

Mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Office Excel 2007 (Microsoft Corporation) wurden die Daten verwaltet. Die statistische Bearbeitung der Daten erfolgte in Kooperation mit der "Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung" des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die graphischen Darstellungen und Tabellen wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft® Office Excel 2007 (Microsoft Corporation) und mit dem Textverarbeitungsprogramm Microsoft® Word 2007 (Microsoft Corporation) angefertigt.

Bei quantitativen Merkmalen erfolgte die Darstellung der Daten mit Hilfe des arithmetischen Mittelwertes ( $\bar{x}_a$ ), der Standardabweichung (s) und des Stichprobenumfangs (n). Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden in aller Regel bis auf zwei Stellen hinter dem Komma angegeben. Da einige Werte nicht normalverteilt vorlagen, wurden sie vor der Berechnung logarithmiert. Um

eine Logarithmierung der Erythrozyten-, Endometrium-, und Gesamtzellzahl zu ermöglichen, wurde den gemessenen Werten 3/8 hinzuaddiert. Bei den Östrogen- und Progesteronwerten wurde bei Werten unterhalb der Nachweisgrenze die Hälfte der Nachweisgrenze für die statistische Berechnung verwendet. Ergebnisse galten ab einem p-Wert von  $\leq 0,05$  als statistisch signifikant.

Um den Einfluss der Anzahl der Endometriumzellen und der Erythrozyten auf die Etablierung einer Trächtigkeit zu überprüfen, wurde das Programm BMDPLR/Release 8.1 (Statistical Solutions Ltd., Irland) verwendet. Mit einer multiplen Regressionstabelle wurden signifikante Zusammenhänge berechnet. Dies wurde gesondert für die erste und alle Trächtigkeitsuntersuchungen insgesamt durchgeführt.

Die Berechnung der Korrelation zwischen der Anzahl von Endometriumzellen, Erythrozyten und der Gesamtzellzahl und dem Entnahmesystem erfolgte mit dem Statistikprogramm BMPD3D/Release 8.1 (Statistical Solutions Ltd., Irland). Bei normalverteilten Werten konnten mit dem t-Test signifikante Zusammenhänge überprüft werden. Mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurden Werte, die trotz Logarithmierung nicht in einer Normalverteilung vorlagen, auf signifikante Zusammenhänge untersucht.

Das Programm BMPD2V/Release 8.1 (Statistical Solutions Ltd., Irland) wurde genutzt, um eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Erythrozyten und Endometriumzellen im Ausstrich abhängig vom Entnahmesystem unter Berücksichtigung folgender Faktoren zu berechnen:

- Parität
- Grad des Uterusödem
- Abstand zwischen Probenentnahme und Ovulation
- Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt

Signifikante Zusammenhänge wurden mit der einfaktoriellen Kovarianzanalyse analysiert.

Auf Grund des Einflusses verschiedener Faktoren (z. B. Alter, Uterusödem oder Parität) wurde das Auftreten von Erythrozyten im Ausstrich abhängig von der Östrogen- bzw. Progesteronkonzentration mit dem Programm BMDPLR/Release 8.1 (Statistical Solutions Ltd., Irland) berechnet. Signifikante oder knapp nicht mehr signifikante Zusammenhänge wurden mit einer linearen Regression genauer untersucht.

Der Zusammenhang zwischen der Etablierung einer Trächtigkeit und Alter, Parität, Anzahl an Erythrozyten, Anzahl der Endometriumzellen und der Gesamtzellzahl im Ausstrich wurde mit dem Programm BMPD7D/Release 8.1 (Statistical Solutions Ltd., Irland) berechnet, wobei mit einer

einfachen Varianzanalyse signifikante Zusammenhänge berechnet wurden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Angaben zum Stutenkollektiv und der gynäkologischen Untersuchung

In die Studie wurden 125 Stuten aufgenommen, von denen 146 intrauterine zytologische Proben sowie 89 Blutproben entnommen wurden. Stuten, deren zytologischer Ausstrich nicht auswertbar war, wurden nicht berücksichtigt. Dadurch ergab sich eine Gesamtprobenzahl von 129 zytologischen und 78 serologischen Proben. Der Altersdurchschnitt der Probanden lag bei  $10,9 \pm 3,9$  (Median 11,0) Jahren. Den größten Anteil der Stuten stellten Maidenstuten mit 46 Tieren (36,8 %), gefolgt von 44 Stuten (35,2 %), die seit mehr als einem Jahr kein Fohlen mehr zur Welt gebracht hatten. Außerdem nahmen 35 Stuten (28 %) teil, die ein Fohlen bei Fuß führten. Die Rasseverteilung ist Abbildung 3 zu entnehmen.

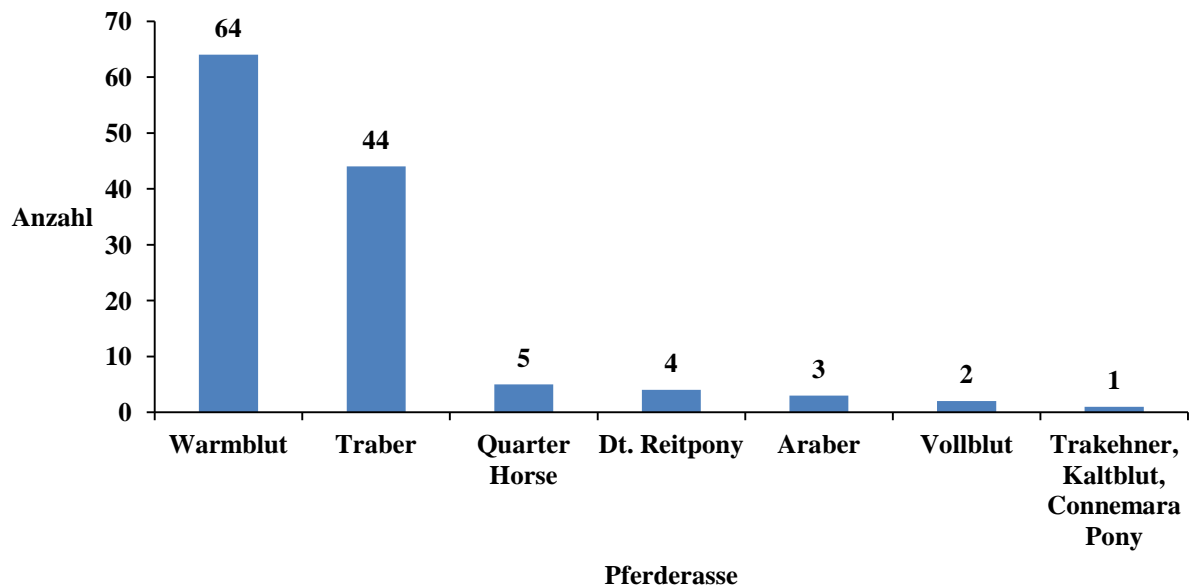


Abbildung 3: Rasseverteilung der untersuchten Stuten (n = 125)

Bei der gynäkologischen Untersuchung wiesen acht Stuten (6,2 %) intrauterine Zysten auf. Bei 14 Untersuchungen (10,9 %) konnten ultrasonographisch uterine Flüssigkeitsansammlungen festgestellt werden. Davon hatten acht Stuten (6,2 %) einen Durchmesser von weniger als zwei Zentimeter, wohingegen bei sechs Stuten (4,7 %) ein Durchmesser von über zwei Zentimeter festgestellt werden konnte.

Während der Fohlenrosse wurden 4 (2,7%), innerhalb des Diöstrus 6 (4,1 %) und während der Rosse wurden 136 (93,2 %) uterine Zellproben entnommen.

Die ultrasonographische Untersuchung des Uterus ergab 64mal eine Ödematisierung des Grad 2. Bei 42 Untersuchungen wurde ein Uterusödem des Grad 3 diagnostiziert. Bei fünf bzw. sechs Überprüfungen des Uterus wurde jeweils ein Ödem Grad 0 bzw. Grad 4 ermittelt. Der Grad 5 wurde, bei vier Untersuchungen festgestellt (Abbildung 4).

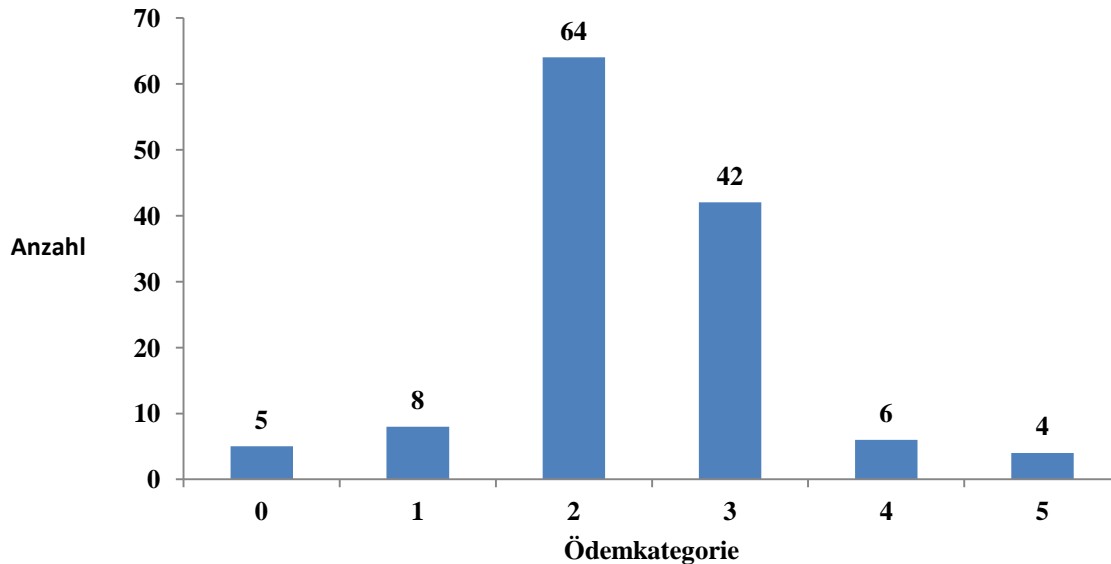


Abbildung 4: Ergebnisse der Uterusödemkategorisierung

## 4. 2 Ergebnisse der exfoliativen Endometriumszytologie

### 4. 2. 1 Zelldifferenzierung

Die Endometriumzellen wiesen violett angefärbte, basal gelegene Kerne auf. Die Nuclei waren von einem angefärbten Zytoplasmasaum umgeben, welcher in vereinzelt Fällen nur schwach angefärbt war.

Eine Gruppen- oder Nesterbildung konnte in erster Linie bei zytologischen Ausstrichen beobachtet werden, die mit Hilfe des Uteruskulturtupfer angefertigt wurden (Abbildung 5). Im Gegensatz dazu waren mit dem CytologyBrush<sup>®</sup> entnommene Zellen vermehrt vereinzelt angeordnet.

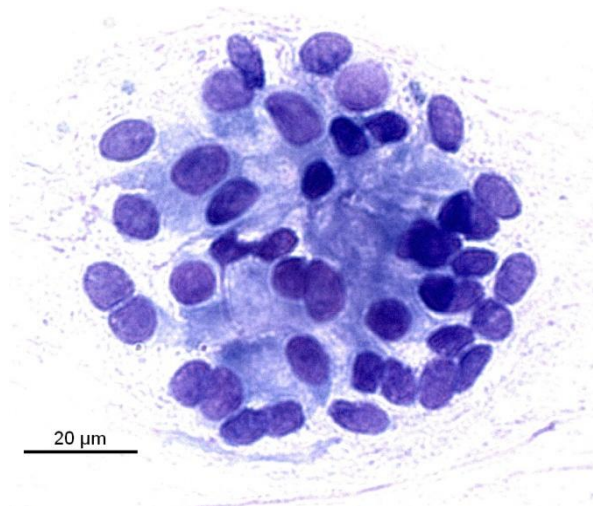


Abbildung 5: Endometriumszytologie einer Stute. Entnahme mit Uteruskulturtupfer und Eosin-Thiazin-Färbung. Gruppenbildung der Endometriumzellen

Desweiteren traten Deformationen in Form von Baumwollfäden oder Zellhaufen besonders bei der Entnahme mit dem Uteruskulturtupfer auf. Diese machten eine Zelldifferenzierung unmöglich, sodass einzelne Zelltypen nicht identifiziert werden konnten (Abbildung 6).

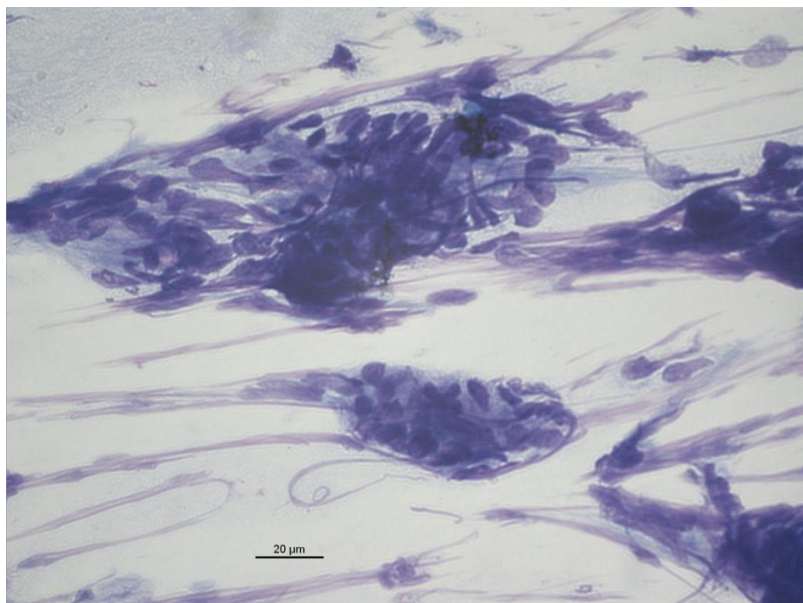


Abbildung 6: Endometriumzellen einer Stute. Entnahme mit Uteruskulturtupfer und Eosin-Thiazin-Färbung. Deformationen der Endometriumzellen in Form von Wattefäden und Zellhaufen

Die durchschnittliche Endometriumzellzahl pro Objektträger, unabhängig vom Entnahmesystem, betrug  $92,85 \pm 55,22$  (Median: 78,00).

Die überwiegende Mehrheit der neutrophilen Granulozyten wies segmentierte Kerne auf



(Abbildung 7). Die durchschnittliche Anzahl dieses Zelltyps belief sich auf  $0,45 \pm 3,76$  (Median: 0,00).

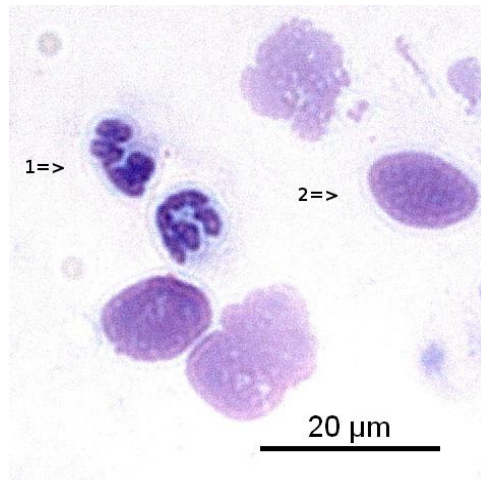


Abbildung 7: Endometriumszytologie einer Stute. Entnahme mit CytologyBrush® und Eosin-Thiazin-Färbung. Es sind sowohl segmentkernige neutrophile Granulozyten (1) als auch lytische Kerne von Endometriumzellen (2) dargestellt.

Deutlich kleiner als die Endometriumzellen und die neutrophilen Granulozyten stellten sich Erythrozyten im zytologischen Ausstrich dar. Sie waren von runder, zum Teil auch stechapfelförmige Form und wiesen eine zentrale Aufhellung auf (Abbildung 8). Im Durchschnitt ließen sich  $20,26 \pm 49,64$  (Median: 78,00) Erythrozyten identifizieren. Die Gesamtzellzahl betrug im Durchschnitt  $113,57 \pm 70,11$  (Median: 98,00).

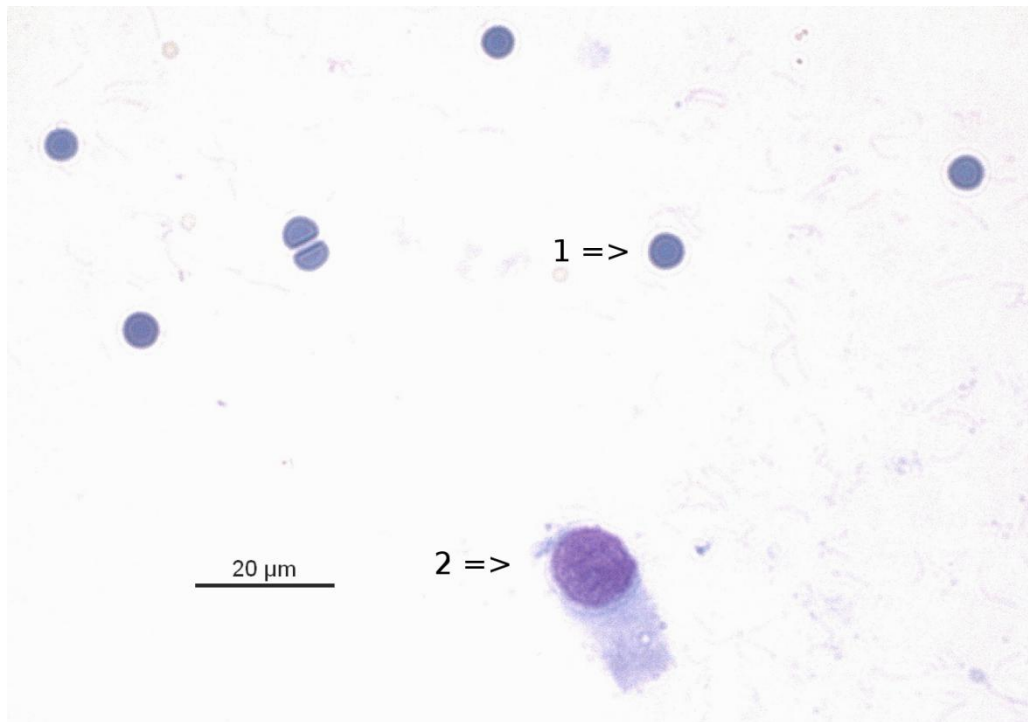


Abbildung 8: Endometriumszytologie einer Stute. Entnahme mit CytologyBrush® und Eosin-Thiazin-Färbung. Es sind sowohl Erythrozyten (1) als auch eine Endometriumzelle (2) dargestellt.

#### 4. 2. 1 Zytologische Parameter

Bei der Entnahme mit dem Uteruskulturtupfer waren insgesamt zwei Proben auf Grund von Geringzelligkeit bzw. Deformationen nicht auswertbar. Die restlichen 55 Proben waren auswertbar. Der CytologyBrush® lieferte insgesamt 78 auswertbare Proben. Eine zu geringe Zellzahl führte bei zwei Proben zum Ausschluss, während neun Zytologien auf Grund von Deformationen aussortiert werden mussten.

#### 4. 3 Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung

Insgesamt wurden 127 Trächtigkeitsuntersuchungen durchgeführt. Davon waren 113 Erstuntersuchungen, zwölf Zweituntersuchungen und zwei Drittuntersuchungen. Bei der ersten Trächtigkeitsuntersuchung waren 65 (57 %) Stuten tragend und 48 (43 %) Tiere nicht trächtig. Die Zweituntersuchung lieferte vier (33 %) trächtige und acht (77 %) nicht tragende Stuten. Bei der Drittuntersuchung konnte jeweils eine Stute (50 %) als tragend bzw. nicht tragend erkannt werden (Tabelle 6). Es konnte bei sechs Stuten (10 %) eine Zwillingsgravidität festgestellt werden.

Tabelle 6: Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung mit Berücksichtigung der Anzahl der Besamungen in der Decksaison

Trächtigkeitsuntersuchung	Untersuchungsnummer bezüglich einer Erst-, Zweit oder Dittbesamung			Insgesamt
	1	2	3	
Positiv	65	4	1	70
Negativ	48	8	1	57
Insgesamt	113	12	2	127

#### 4.4 Ergebnis des hormonellen Status

Insgesamt wurden von 89 Stuten Blutserumproben entnommen, wobei lediglich von 78 Stuten der Östradiol-17- $\beta$ - und der Progesteronspiegel bestimmt wurde.

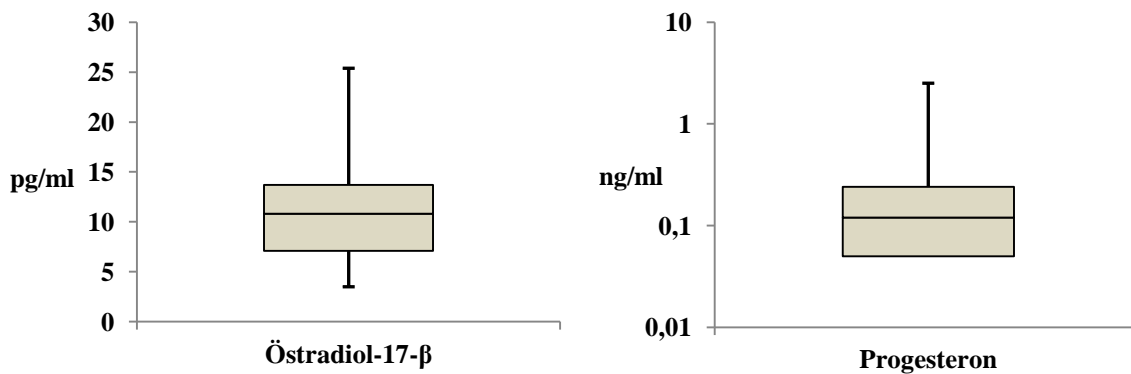


Abbildung 9: Darstellung der Östradiol-17- $\beta$ - und Progesteron-Werte von 71 Stuten als Box and Whisker Plot. Sieben Stuten wurden zweimal innerhalb der gleichen Decksaison untersucht

#### 4. 5 Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der exfoliativen Endometriumszytologie und dem Entnahmesystem

Die durchschnittliche Gesamtzellzahl des CytologyBrush® betrug  $129,05 \pm 64,93$  (Median: 124,00), während dieser Parameter beim Uteruskulturtupfer bei  $89,89 \pm 71,73$  (Median: 68,00) lag (Tabelle 7; Abbildung 10).

Mit dem t-Test konnte gezeigt werden, dass der CytologyBrush® hoch signifikant mehr Zellen als der Uteruskulturtupfer im Ausstrich liefert ( $p < 0,0001$ ).

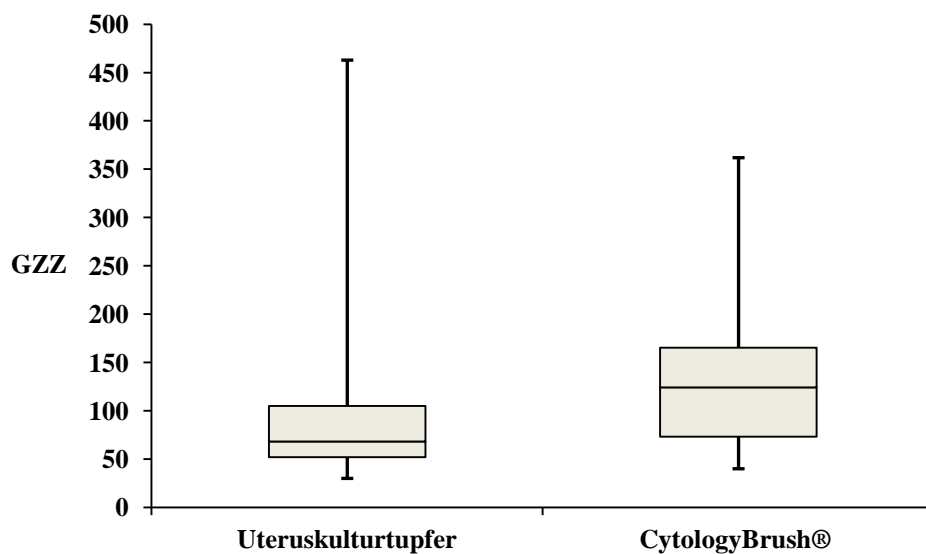


Abbildung 10: Darstellung der Gesamtzellzahl (GZZ) in exfoliativen Endometriumszytologien von der Stute, entnommen mit dem CytologyBrush® bzw. Uteruskulturtupfer als Box and Whisker Plot dargestellt (10 Gesichtsfelder bei 200facher Vergrößerung)

## Ergebnisse

Mit dem CytologyBrush® konnten im Durchschnitt  $115,81 \pm 56,12$  (Median: 108,50) Endometriumzellen im Ausstrich nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren beim Uteruskulturtupfer lediglich  $57,75 \pm 29,60$  (Median: 48,00) Endometriumzellen nachweisbar (Tabelle 7; Abbildung 11).

Mit dem CytologyBrush® konnten hochsignifikant mehr Endometriumzellen als mit Uteruskulturtupfer im Ausstrich nachgewiesen werden ( $p < 0,0001$ ).

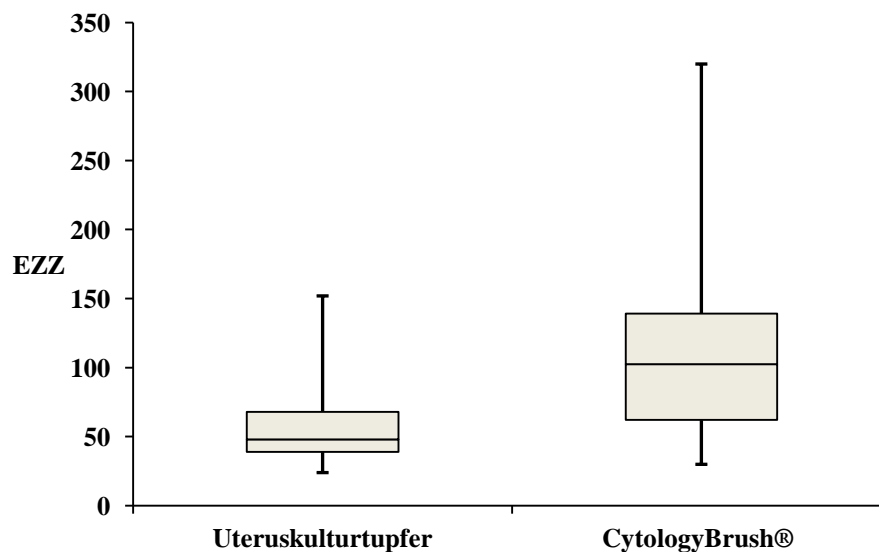


Abbildung 11: Darstellung der Endometriumzellzahl (EZZ) in exfoliativen Endometriumszytologien von der Stute, entnommen mit dem CytologyBrush® bzw. Uteruskulturtupfer und als Box and Whisker Plot dargestellt (10 Gesichtsfelder bei 200facher Vergrößerung)

Im Durchschnitt ließen sich  $12,50 \pm 24,78$  (Median: 2,00) Erythrozyten mit dem CytologyBrush® und  $32,14 \pm 71,59$  (Median: 7,00) rote Blutzellen mit dem Uteruskulturtupfer im Ausstrich nachweisen (Tabelle 7, Abbildung 12).

Der Zusammenhang zwischen Entnahmesystem und Nachweis von Erythrozyten im Ausstrich ist statistisch nicht signifikant ( $p = 0,058$ ).

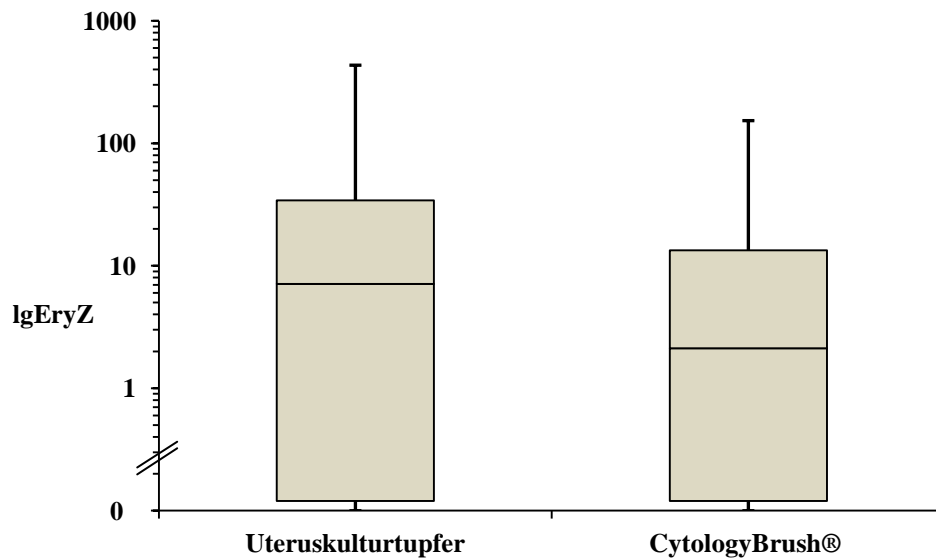


Abbildung 12: Darstellung der Erythrozytenzahl (EryZ) in exfoliativen Endometriumszytologien von der Stute, entnommen mit dem CytologyBrush® bzw. Uteruskulturtupfer und als Box and Whisker Plot dargestellt (10 Gesichtsfelder bei 200facher Vergrößerung)

Mit dem Entnahmesystem CytologyBrush® ließen sich im Durchschnitt  $0,74 \pm 4,83$  (Median: 0,00) neutrophile Granulozyten nachweisen, wohingegen mit dem Uteruskulturtupfer keine Zellen dieses Typs nachgewiesen werden konnten (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zusammenfassung der gewonnen Zellzahlen im Vergleich der Entnahmesysteme (MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung)

Entnahmesystem	MW $\pm$ SD	Median
<b>Gesamtzellzahl</b>		
CytologyBrush®	$129,05 \pm 64,93$	124,00
Uteruskulturtupfer	$89,89 \pm 71,73$	68,00
<b>Endometriumzellen</b>		
CytologyBrush®	$115,81 \pm 56,12$	108,50
Uteruskulturtupfer	$57,75 \pm 29,60$	48,00
<b>Erythrozyten</b>		
CytologyBrush®	$12,50 \pm 24,78$	2,00
Uteruskulturtupfer	$32,14 \pm 71,59$	7,00
<b>Neutrophile Granulozyten</b>		
CytologyBrush®	$0,74 \pm 4,83$	0,00
Uteruskulturtupfer	$0,00 \pm 0,00$	0,00

#### 4. 6 Einflussfaktoren auf das Ergebnis der exfoliativen Endometriumszytologie

##### 4. 6. 1 Einfluss des hormonellen Status auf die Zellzahl

###### Gesamtzellzahl

Die mögliche Korrelation zwischen der Gesamtzellzahl und dem Östradiol-17- $\beta$ - bzw. Progesteronspiegel wurde mit einer multiplen linearen Regression überprüft. Die Parität, das Uterusödem, das Alter und der Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt bzw. Ovulation wurden ebenfalls in die Berechnung mit einbezogen.

Hierbei konnte ein statistisch signifikant positiver Zusammenhang zwischen dem Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel ( $p = 0,05$ ) und der Gesamtzellzahl gezeigt werden (Tabelle 8).

Tabelle 8: Ergebnisse der multiplen linearen Regression zur Beeinflussung der Gesamtzellzahl bei Stuten in der exfoliativen Endometriumszytologie

Variable	p-Wert
Parität	0,19
Uterusödem	0,52
Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt	0,67
lgAbstand zwischen Probenentnahme und Ovulation	0,83
Alter	0,91
<b><i>lgÖstradiol-17-<math>\beta</math>-Spiegel</i></b>	<b><i>0,05</i></b>
lgProgesteronspiegel	0,98

Anschließend wurde eine lineare Regression durchgeführt, um diesen Zusammenhang zwischen Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel und der Gesamtzellzahl genauer zu überprüfen. Hierbei konnte der statistisch signifikant positive Zusammenhang zwischen dem Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel und der Gesamtzellzahl bestätigt werden ( $p = 0,01$ ;  $r = 0,2$ ). Diesbezüglich konnte eine Erhöhung der Gesamtzellzahl im Ausstrich um den Faktor 1,25 bei einer Verdoppelung des Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel nachgewiesen werden (Abbildung 13).



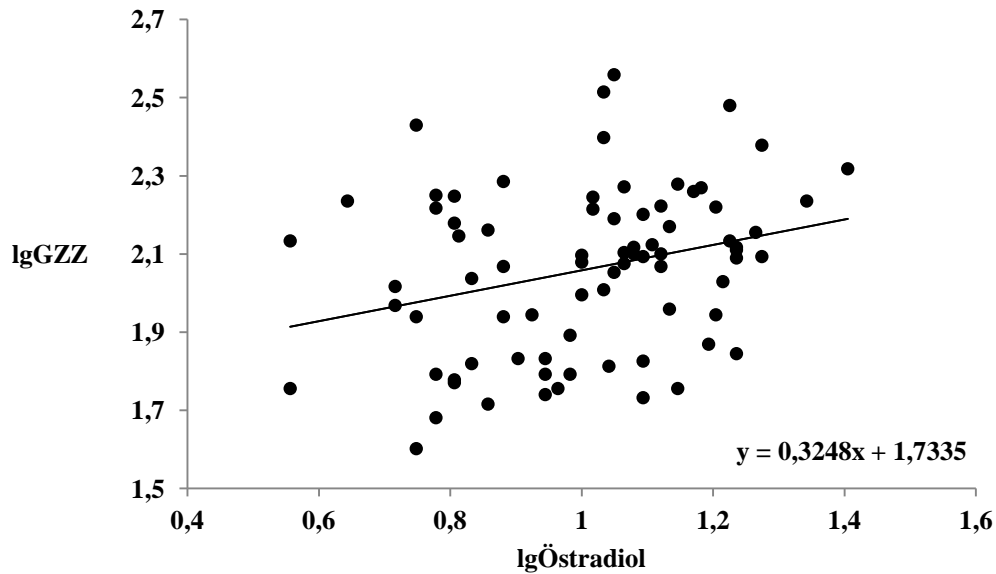


Abbildung 13: Zusammenhang zwischen der Gesamtzellzahl (GZZ) pro Objektträger mit CytologyBrush® und Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel. Der Zusammenhang war statistisch signifikant ( $p = 0,01$ ;  $r = 0,2$ ) (lg = Logarithmierung zur Basis 10 um eine Normalverteilung der Messwerte zu erreichen)

#### Endometriumzellzahl

Die potentielle Korrelation zwischen der Endometriumzellzahl und dem Östradiol-17- $\beta$ - bzw. Progesteronspiegel wurde mit einer multiplen linearen Regression berechnet. Hierbei wurden ebenfalls die Parität, das Uterusödem, das Alter und der Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt bzw. Ovulation berücksichtigt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass ein statistisch signifikant negativer Zusammenhang zwischen der Endometriumzellzahl und der Parität ( $p = 0,04$ ) besteht. Die Korrelation zwischen der Endometriumzellzahl und dem Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel ( $p = 0,07$ ) war statistisch nicht signifikant (Tabelle 9).

Tabelle 9: Ergebnisse der multiplen linearen Regression zur Beeinflussung der Endometriumzellzahl bei Stuten in der exfoliativen Endometriumszytologie

Variable	p-Wert
<i>Parität</i>	<i>0,04</i>
Uterusödem	0,61
Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt	0,36
lgAbstand zwischen Probenentnahme und Ovulation	0,83
Alter	0,85
<i>lgÖstradiol-17-<math>\beta</math>-Spiegel</i>	<i>0,07</i>
lgProgesteronspiegel	0,90

In der linearen Regression konnte bestätigt werden, dass statistisch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel und der Endometriumzellzahl in der exfoliativen Endometriumszytologie bei der Stute besteht ( $p = 0,058$ ;  $r = 0,22$ ) (Abbildung 14).

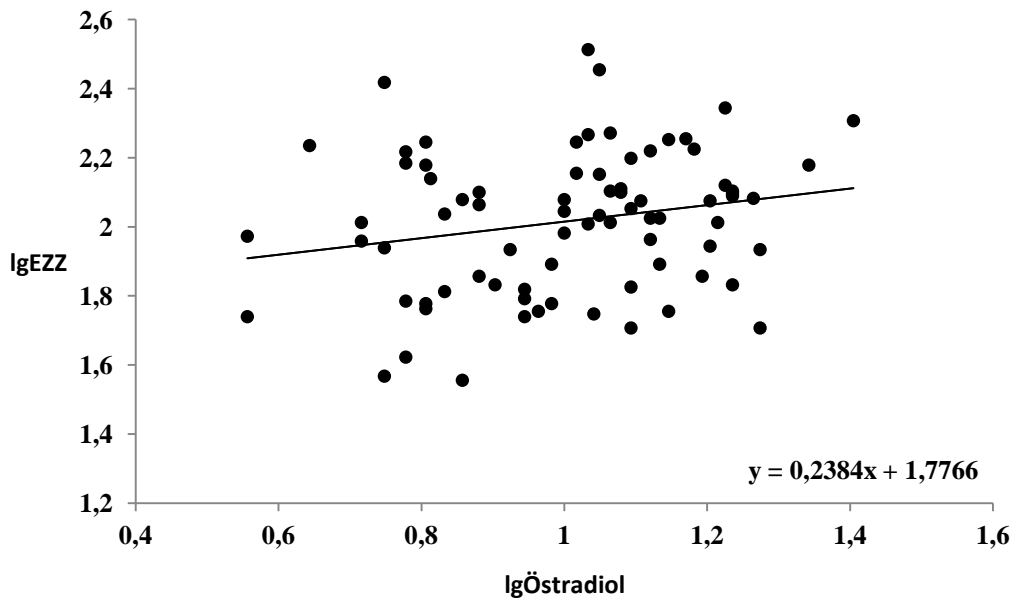


Abbildung 14: Zusammenhang zwischen Endometriumzellzahl (EZZ) pro Objektträger mit CytologyBrush® und Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel. Der Zusammenhang war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,058$ ;  $r = 0,22$ ) (lg = Logarithmierung zur Basis 10 um eine Normalverteilung der Messwerte zu erreichen)

Die statistisch signifikant negative Korrelation zwischen der Endometriumzellzahl und der Parität konnte in der linearen Regression bestätigt werden ( $p = 0,008$ ;  $r = -0,232$ ). Eine Abnahme der Endometriumzellzahl um 6 % pro Geburt konnte sichtbar gemacht werden (Abbildung 15).

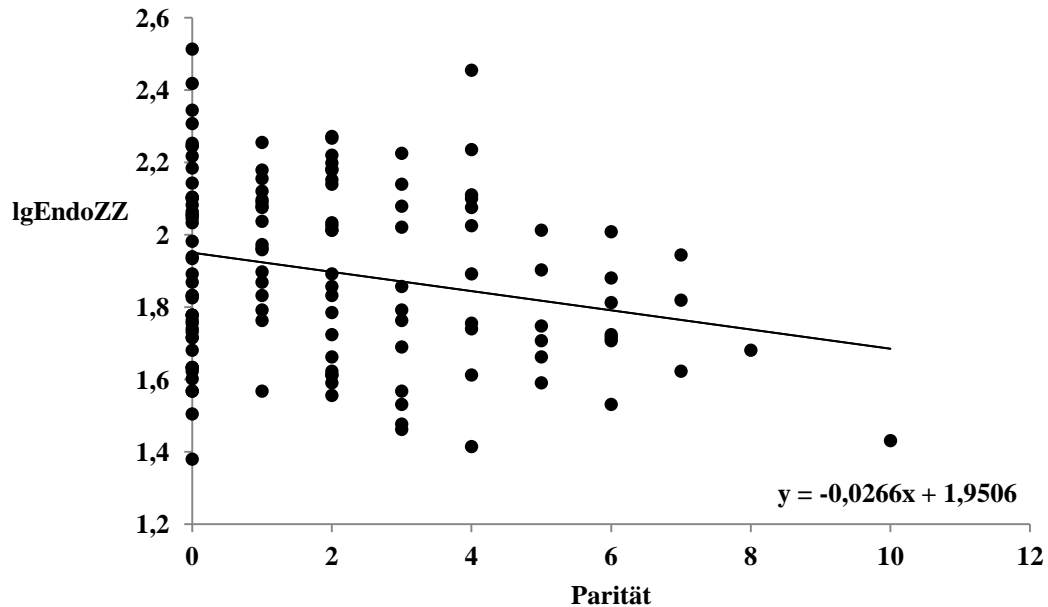


Abbildung 15: Zusammenhang zwischen Endometriumzellzahl (EZZ) pro Objektträger mit CytologyBrush<sup>®</sup> und der Parität. Der Zusammenhang war statistisch signifikant ( $p = 0,008$ ;  $r = -0,2$ ) (lg = Logarithmierung zur Basis 10 um eine Normalverteilung der Messwerte zu erreichen)

## Erythrozyten

Der mögliche Zusammenhang zwischen der Anzahl roter Blutkörperchen in der exfoliativen Endometriumszytologie bei der Stute und dem Östradiol-17- $\beta$ - bzw. Progesteronspiegel wurde mit einer multiplen linearen Regression untersucht. Dabei wurden die Parität, das Uterusödem, das Alter und der Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt bzw. Ovulation in die Berechnung einbezogen.

Die multiple lineare Regression konnte einen statistisch signifikant positiven Zusammenhang ( $p = 0,01$ ) zwischen dem Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel und der Erythrozytenzahl im Ausstrich zeigen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Ergebnisse der multiplen linearen Regression zur Beeinflussung der Erythrozytenzahl bei Stuten in der exfoliativen Endometriumszytologie

Variable	p-Wert
Parität	0,53
Uterusödem	0,86
Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt	0,36
lgAbstand zwischen Probenentnahme und Ovulation	0,75
Alter	0,19
<b><i>lgÖstradiol-17-<math>\beta</math>-Spiegel</i></b>	<b><i>0,01</i></b>
lgProgesteronspiegel	0,75

Daraufhin wurde der Zusammenhang zwischen der Erythrozytenzahl und dem Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel mit einer linearen Regression untersucht und der beschriebene Zusammenhang konnte bestätigt werden ( $p = 0,003$ ;  $r = 0,33$ ). Dabei konnte gezeigt werden, dass sich bei einer Verdoppelung des Östradiol-17- $\beta$ -Spiegels sich die Erythrozytenzahl um den Faktor 2,57 erhöht (Abbildung 16).

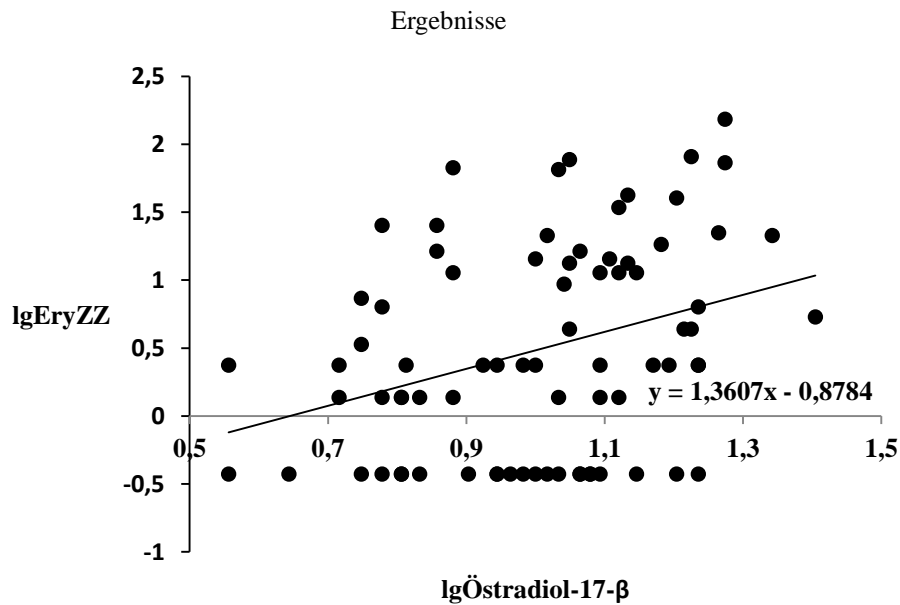


Abbildung 16: Zusammenhang zwischen Östradiol-17-β-Spiegel und Erythrozytenzahl (EryZZ) pro Objektträger mit CytologyBrush®. Der Zusammenhang war statistisch hoch signifikant ( $p = 0,003$ ;  $r = 0,33$ ) (lg = Logarithmierung zur Basis 10 um eine Normalverteilung der Messwerte zu erreichen)

#### 4. 6. 2 Einfluss anamnestischer Daten, des Uterusödems und des Abstandes zwischen Probenentnahme und Geburt bzw. der Ovulation auf die Zellzahl

Abhängig vom Entnahmesystem konnte die Kovarianzanalyse keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Gesamtzellzahl und Parität, Alter, Uterusödem und Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt bzw. Ovulation zeigen (Tabelle 11).

Ein hoch signifikanter Zusammenhang ( $p < 0,0001$ ) zwischen dem Entnahmesystem und der Gesamtzellzahl konnte bereits mit dem t-Test gezeigt werden und wurde durch die erfolgte Kovarianzanalyse bestätigt ( $p = 0,001$ ).

Tabelle 11: Ergebnisse der multiplen Kovarianzanalyse zur Beeinflussung der Gesamtzellzahl bei Stuten in der exfoliativen Endometriumszytologie

<b>Variable</b>	<b>p-Wert</b>
<i>Entnahmemethode</i>	<i>0,001</i>
Parität	0,51
Uterusödem	0,81
Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt	0,73
lgAbstand zwischen Probenentnahme und Ovulation	0,91
Alter	0,49

Bei der Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Endometriumzellzahl und dem Entnahmesystem ( $p < 0,001$ ), der Parität ( $p = 0,076$ ), dem Alter, dem Abstand zwischen der Probenentnahme und der letzten Geburt bzw. Ovulation und dem Uterusödem konnte keine statistisch signifikante Korrelation gezeigt werden (Tabelle 12). Der Zusammenhang zwischen der Parität und der Anzahl von Endometriumzellen war knapp nicht signifikant, deshalb wurde dieser Zusammenhang zusätzlich mit einer linearen Regression untersucht. Dabei konnte eine statistisch signifikant negative Korrelation zwischen der Endometriumzellzahl und der Parität dargestellt ( $p = 0,008$ ;  $r = -0,23$ ) und eine Abnahme der Endometriumzellzahl um 6 % pro Geburt ermittelt werden (Abbildung 15). Mit dem t-Test wurde bereits ein hochsignifikanter Zusammenhang ( $p < 0,0001$ ) zwischen dem Entnahmesystem und der Endometriumzellzahl im Ausstrich nachgewiesen.

Tabelle 12: Ergebnisse der multiplen Kovarianzanalyse zur Beeinflussung der Endometriumzellzahl bei Stuten in der exfoliativen Endometriumszytologie

Variable	p-Wert
Entnahmemethode	< 0,001
<i>Parität</i>	<i>0,076</i>
Uterusödem	0,15
Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt	0,75
lgAbstand zwischen Probenentnahme und Ovulation	0,21
Alter	0,95



## Ergebnisse

Es konnte statistisch kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Erythrozytenzahl und der Parität, dem Entnahmesystem, dem Alter, dem Uterusödem, dem Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt bzw. Ovulation gezeigt werden (Tabelle 13).

Tabelle 13: Ergebnisse der multiplen Kovarianzanalyse zur Beeinflussung der Erythrozytenzahl bei Stuten in der exfoliativen Endometriumszytologie

<b>Variable</b>	<b>p-Wert</b>
Entnahmemethode	0,22
Parität	0,43
Uterusödem	0,55
Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt	0,95
lgAbstand zwischen Probenentnahme und Ovulation	0,99
Alter	0,49

#### 4. 7 Einflussfaktoren auf die Etablierung einer Trächtigkeit

##### 4. 7. 1 Ergebnis der exfoliativen Endometriumszytologie

##### 4. 7. 1. 1 Einfluss der Zusammensetzung der exfoliativen Endometriumszytologie bei der Stute auf die Etablierung einer Trächtigkeit bezogen auf die erste Besamung innerhalb der Decksaison

Der Zusammenhang zwischen der Etablierung einer Trächtigkeit und der Gesamt-, Endometrium- und Erythrozytenzahl in Korrelation zu Parität, Uterusödem, Alter, Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt bzw. Ovulation, dem Progesteron- und Östrogenspiegel wurde mit Hilfe einer multiplen logistischen Regression berechnet. Dabei konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Parametern gezeigt werden (Tabelle 14).

Tabelle 14: Ergebnis der multiplen logistischen Regression zur Beeinflussung der Etablierung einer Trächtigkeit bei der Stute, bezogen auf die erste Besamung in der Decksaison (lg = Logarithmierung zur Basis 10 um eine Normalverteilung der Messwerte zu erreichen)

<b>Parameter</b>	<b>p-Wert</b>
Parität	0,29
Uterusödem	0,77
Alter	0,77
lgGesamtzellzahl	0,35
lgEndometriumzellzahl	0,16
lgErythrozytenzahl	0,21
Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt	0,62
lg Abstand zwischen Probenentnahme und Ovulation	0,59

## Ergebnisse

Parameter	p-Wert
lgProgesteron	0,21
lgÖstrogen	0,13

### 4. 7. 1. 2 Einfluss der Zusammensetzung der exfoliativen Endometriumszytologie bei der Stute auf die Etablierung einer Trächtigkeit unabhängig von der Besamungshäufigkeit

Die Korrelation zwischen Etablierung einer Trächtigkeit und der Gesamtzellzahl, Endometriumzellzahl sowie der Erythrozytenzahl in Zusammenhang mit der Parität, dem Uterusödem, Alter, Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt bzw. Ovulation, dem Progesteron- und Östrogenspiegel wurde mit Hilfe einer multiplen logistischen Regression berechnet. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Etablierung einer Trächtigkeit und den genannten Parametern gezeigt werden (Tabelle 15).

Tabelle 15: Ergebnis der multiplen logistischen Regression bezüglich der Etablierung einer Trächtigkeit bei der Stute (lg = Logarithmierung zur Basis 10 um eine Normalverteilung der Messwerte zu erreichen)

Parameter	p-Wert
Parität	0,24
Uterusödem	0,98
Alter	0,96
lgGesamtzellzahl	0,49
lgEndometriumzellzahl	0,32
lgErythrozytenzahl	0,28
Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt	0,38

## Ergebnisse

<b>Parameter</b>	<b>p-Wert</b>
lg Abstand zwischen Probenentnahme und Ovulation	0,55
lg Abstand zwischen Probenentnahme und Ovulation	0,55
lgProgesteron	0,37
lgÖstrogen	0,16

### 4. 7. 2 Anamnese

Stuten, die seit mehr als einem Jahr kein Fohlen mehr zur Welt gebracht hatten, wiesen mit 60 % (n = 31) die höchste Trächtigkeitsrate auf. Gefolgt von Stuten, die ein Fohlen bei Fuß führten, mit 57 % (n = 17). Mit 48 % (n = 22) hatten Maidenstuten die niedrigste Trächtigkeitsrate (Tabelle 16).

Tabelle 16: Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung. Einteilung der Stuten nach dem Resultat der Anamnese (TU = Trächtigkeitsuntersuchung)

	<b>Stuten, die seit mehr als einem Jahr kein Fohlen mehr zur Welt gebracht haben</b>	<b>Stuten mit Fohlen bei Fuß</b>	<b>Maidenstuten</b>	<b>Insgesamt</b>
<b>TU positiv</b>	31 (60 %)	17 (57 %)	22 (48 %)	70 (55 %)
<b>TU negativ</b>	20 (40 %)	13 (43 %)	24 (52 %)	57 (45 %)
<b>Insgesamt</b>	51	30	46	127

### 4. 7. 3 Gynäkologische Untersuchung

Bei Stuten mit intrauterinen Zysten lag die Trächtigkeitsrate bei 43 % (n = 3). Von acht Stuten, die eine intrauterine Flüssigkeitsansammlung von < 2 cm aufwiesen, konnte lediglich bei 2 Tieren (29 %) eine Trächtigkeit etabliert werden. Bei Flüssigkeitsansammlung von größer als zwei Zentimeter

konnte nur bei einer Stute (17 %) eine Trächtigkeit nachgewiesen werden.

Eine Stute mit uterinen Zysten und intrauterinen Flüssigkeitsansammlungen von weniger als zwei Zentimeter konnte erfolgreich besamt werden (Tabelle 17).

Tabelle 17: Resultat der Trächtigkeitsuntersuchung. Einteilung der Resultate nach den Ergebnissen der gynäkologischen Untersuchung (TU = Trächtigkeitsuntersuchung)

	<b>Zysten</b>	<b>&lt; 2cm Flüssigkeit</b>	<b>&gt; 2 cm Flüssigkeit</b>	<b>Zysten + &lt; 2 cm Flüssigkeit</b>	<b>Insgesamt</b>
TU positiv	3 (43 %)	2 (29 %)	1 (17 %)	1 (100 %)	6
TU negativ	4 (57 %)	5 (71 %)	5 (83 %)	0 (0 %)	15
Insgesamt	7	7	6	1	21

#### 4. 7. 4 Konserviertes Sperma

Die Trächtigkeitsrate bei Stuten, die mit Tiefgefriersperma besamt wurden (n = 72), betrug 53 % (n = 36) . Der Anteil an Stuten (n = 59), die erfolgreich mit flüssigkonserviertem Sperma besamt wurden, lag bei 54 % (n = 32) (Tabelle 18).

Tabelle 18: Resultat der Trächtigkeitsuntersuchung. Einteilung nach Art des verwendeten Spermas (TG = tiefgefrorenes Sperma)

	<b>TG</b>	<b>Flüssigkonserviert</b>	<b>Insgesamt</b>
TU positiv	36 (53 %)	32 (54 %)	69
TU negativ	32 (47 %)	27 (46 %)	59
Insgesamt	68	59	127

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Fragestellung

Bereits 1964 wurde die exfoliative Endometriumszytologie als Bestandteil der gynäkologischen Untersuchung der Stute von Knudsen eingeführt. Bei der Interpretation der angefertigten zytologischen Ausstriche hatte er lediglich der Anwesenheit neutrophiler Granulozyten Beachtung geschenkt, um eine Entzündung des Endometriums zu diagnostizieren. Bei einem Großteil der späteren Untersuchungen wurde das Hauptaugenmerk der Beurteilung der exfoliativen Endometriumszytologien ebenfalls auf die Präsenz von neutrophilen Granulozyten gelegt (Tillmann und Lauer, 1977; Digby, 1978; Mattos et al., 1984; Brook, 1985; Couto und Hughes, 1985; Reinemund, 1988; Dascanio, 2003; Card, 2005; Aguilar et al., 2006; Riddle et al., 2007; Overbeck et al., 2011; Nielsen et al., 2012).

Lediglich vereinzelte Studien haben Anzeichen von Zellschäden (LaCour, 1985) und die Anwesenheit von Erythrozyten in der Auswertung der zytologischen Proben berücksichtigt (LaCour, 1985; Neuberg, 2009). Bisher konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten vor allem post partum (Saltiel et al., 1987), während einer akuten Endometritis (Digby, 1978; Couto und Hughes, 1984; Brook, 1985) und abhängig vom Entnahmesystem im zytologischen Ausstrich auftreten können (Neuberg, 2009).

Ebenso konnte ein Zusammenhang zwischen der Anzahl von Endometriumzellen pro Gesichtsfeld und dem Entnahmesystem belegt werden (Neuberg, 2009).

Weitere Informationen über Faktoren, die das Auftreten von Erythrozyten und Endometriumzellen im Ausstrich beeinflussen, liegen bisher nicht vor.

Die Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten (Mattos et al., 1984; LaCour, 1985; Riddle et al., 2007) bzw. von Zelltrümmern (LaCour, 1985) im zytologischen Ausstrich als Folge einer Endometritis wurden genutzt, um eine Prognose hinsichtlich der Etablierung einer Trächtigkeit zu erstellen. Es liegen jedoch keine Daten über den potentiellen Einfluss der Anzahl von Erythrozyten und Endometriumzellen auf die Etablierung einer Trächtigkeit vor.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, diese Informationslücke zu schließen, um eine spezifischere Interpretation der exfoliativen Endometriumszytologie zu ermöglichen und eine fundiertere Prognose hinsichtlich der Etablierung einer Trächtigkeit formulieren zu können.

## 5. 2 Diskussion der Methodik

### 5. 2. 1 Stuten

Die Studie wurde an einer heterogenen Gruppe von Patientenstuten und nicht an einer definierten Gruppe von Versuchstieren durchgeführt, um repräsentative Ergebnisse zu erhalten, die unter Praxisbedingungen zu erwarten sind. Zudem sollten nur Proben ausgewertet werden, die im Rahmen einer gynäkologischen Untersuchung entnommen wurden, um die Verhältnisse der Praxis widerzuspiegeln.

Bei 125 Tieren wurden 146 zytologische Proben des Endometriums gewonnen, bei 77 Stuten wurden zusätzlich Blutproben entnommen, wobei einigen Stuten mehrmals Probenmaterial entnommen wurde, da sie wegen Umrossen erneut zur Besamung vorgestellt wurden. Jeder angefertigten Probe konnte ein eigenständiges Ergebnis zugeordnet werden. Nur hinsichtlich des Resultats der exfoliativen Endometriumszytologie und dem Ergebnis der Trächtigkeitsuntersuchung wurde zwischen einer Erst-, Zweit- oder Drittuntersuchung unterschieden, um eine Pseudoreplikation zu vermeiden. Mit 10,9 Jahren liegt das Durchschnittsalter der Stuten im Bereich von anderen Studien (Riddle et al., 2007; Neuberg, 2009; Overbeck et al., 2011; Cocchia et al., 2012). Daraus lässt sich ableiten, dass das untersuchte Stutenkollektiv repräsentativ ist.

Die fehlende Differenzierung der Stuten, die seit mehr als einem Jahr kein Fohlen geboren haben, in güste Stuten, Stuten mit Trächtigkeitsproblemen und einjährig bzw. mehrjährig nicht besamte Stuten, muss bei der Interpretation der Resultate der Trächtigkeitsuntersuchung berücksichtigt werden.

### 5. 2. 2 Intrauterine Probenentnahme

Die Resultate von intrauterinen zytologischen und bakteriologischen Untersuchungen sind bei Entnahme mit unbedeckten Entnahmesystemen nicht repräsentativ für die Situation in der Gebärmutter, da oftmals eine zervikal oder vaginale Kontamination des Probenmaterials nicht vermieden werden kann (Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Aguilar et al., 2006; Klein et al., 2009). Um solche Verunreinigungen zu vermeiden, wurden nur doppelt geschützte Entnahmesysteme verwendet.

Bereits seit Jahren ist der Uteruskulturtupfer ein etabliertes und erprobtes Instrument zur Entnahme und Anfertigung von exfoliativen Endometriumszytologien (Digby, 1978; Brook, 1993; Neuberg, 2009; Overbeck et al., 2011; Cocchia et al., 2012).

Neben diesem System haben sich in den letzten Jahren Zytologiebürstchen als Entnahmesysteme für die intrauterine Entnahme von Zellproben bei der Zuchtstute etabliert (Neuberg, 2009; Overbeck

et al., 2011; Cocchia et al., 2012). Solche Bürstchen werden bereits erfolgreich in der Rinderpraxis zur Erkennung von Endometritiden (Barlund et al., 2008; Baranski et al., 2012) eingesetzt. Im Vergleich der beiden Entnahmesysteme CytologyBrush® und dem Uteruskulturtupfer für Pferde gelang der Nachweis von Erythrozyten signifikant besser mit dem CytologyBrush® (Neuberg, 2009).

Um die Fragestellung in der vorliegenden Untersuchung unabhängig vom Entnahmesystem klären zu können, wurden beide Systeme verwendet. Jedoch wurde jeder Stute entweder mit dem CytologyBrush® oder dem Uteruskulturtupfer eine zytologische Probe entnommen, um eine iatrogene Schädigung des Endometriums und damit falsch-positive Resultate zu vermeiden.

Vor der Probenentnahme wurde die Stute in einem Zwangsstand fixiert, das äußere Genitale gereinigt und der Schweif eingebunden. Dieses Vorgehen wird von vielen Autoren als Standard angesehen (Brook, 1985; LaCour, 1985; Ley et al., 2001; Dascanio, 2003; Card, 2005).

Mit Hilfe eines Spreizspekulums nach Polansky wurden die Entnahmesysteme in den Uterus eingeführt und das Probenmaterial entnommen, um eine Kontamination mit vaginalem Material zu vermeiden. Dies ermöglichte auch eine Beurteilung der Vagina und der Portio vaginalis. Jedoch sehen einigen Autoren das manuelle Einbringen des Entnahmesystems in den Uterus unter Verwendung doppelt geschützter Entnahmesysteme als ausreichend an (Digby, 1978; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Couto und Hughes, 1984; Brook, 1993). Zudem beschreibt Walter (2009), dass einige Stuten das Einbringen eines Spreizspekulums schlecht tolerieren. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte dies nicht bestätigt werden.

Verschiedene Autoren beschreiben, dass eine Fixierung der zytologischen Proben sinnvoll ist (Couto und Hughes, 1984; Ley et al., 2001), vor allem falls die Färbung nicht innerhalb von 24 Stunden erfolgt (Dascanio et al., 1997). Auf Grund dessen wurde das entnommene und auf einem Objektträger ausgerollte Zellmaterial unverzüglich mit einem handelsüblichen Fixationsspray behandelt.

Das angefertigte Probenmaterial wurde mit der Eosin-Thiazin-Färbemethode angefärbt, da dieses Verfahren schnell und einfach durchzuführen ist, eine gute Zelldifferenzierung ermöglicht und sich in der Praxis durchgesetzt hat (Couto und Hughes, 1984; Neuberg, 2009; Walter et al., 2011).

### 5. 2. 3 Zytologische Untersuchung

In der Literatur lassen sich viele verschiedene Möglichkeiten zur Interpretation der exfoliativen Endometriumszytologie von Zuchtstuten finden (Knudsen, 1964; Tillmann und Lauer, 1977; Digby, 1978; Knudsen, 1982; Wingfield Digby und Ricketts, 1982; Couto und Hughes, 1984; Slusher et al., 1984; Brook, 1985; Ricketts und Mackintosh, 1987; Ball et al., 1988; Dascanio et al., 1997; Card,



2005; Riddle et al., 2007; Walter und Wehrend, 2007, Overbeck et al., 2011, 2011, Cocchia et al., 2012). Im Wesentlichen lässt sich diese Vielzahl an Möglichkeiten in zwei verschiedene Ansätze differenzieren (Brook, 1993):

- Absolute Anzahl neutrophiler Granulozyten pro Gesichtsfeld
- Verhältnis Endometriumzellen zu neutrophilen Granulozyten

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde eine komplette Auszählung aller Zelltypen durchgeführt, da der Fokus nicht auf den neutrophilen Granulozyten, sondern auf den Erythrozyten und Endometriumzellen lag. Besonders hinsichtlich des Nachweises und der Anzahl von Erythrozyten stellte dieses Vorgehen einen sehr sensitiven und genauen Nachweis dar, da bisher deren Anzahl lediglich geschätzt wurde (LaCour, 1985; Ehlers, 2000; Neuberg, 2009).

### 5. 3 Diskussion der Ergebnisse

#### 5. 3. 1 Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der exfoliativen Endometriumszytologie und dem Entnahmesystem

Um die Interpretationsmöglichkeit der exfoliativen Endometriumszytologie zu verbessern, sollte geklärt werden, ob die Anzahl der Endometriumzellen, Erythrozyten und die Gesamtzellzahl durch das Entnahmesystem beeinflusst werden kann.

Hierfür wurden alle Zelltypen ausgezählt, wobei eine Abhängigkeit zwischen der Anzahl neutrophiler Granulozyten vom Entnahmesystem nicht überprüft wurde, da dieser Zelltyp lediglich sehr vereinzelt nachgewiesen wurde und eine statistische Bearbeitung daher nicht sinnvoll erschien.

Im Vergleich der beiden Entnahmesysteme konnte gezeigt werden, dass der CytologyBrush® signifikant mehr auswertbare Zellen im Ausstrich liefert als der Uteruskulturtupfer. Dieser Zusammenhang stimmt mit den Erkenntnissen der Literatur überein (Bourke et al., 1997; Neuberg, 2009; Overbeck et al., 2011; Cocchia et al., 2012).

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des CytologyBrush® hochsignifikant mehr auswertbare Endometriumzellen im Ausstrich nachgewiesen werden können, als mit dem Uteruskulturtupfer. Sowohl Neuberg (2009) als auch Bourke et al. (1997) und Defontis et al. (2011) konnten zeigen, dass Zytologiebürstchen im Vergleich zu einem Baumwolltupfer mehr auswertbare Endometriumzellen im Ausstrich liefern. Dies liegt vermutlich daran, dass der CytologyBrush® die

Endometriumzellen besser aufnehmen kann. Die durchschnittliche Endometriumzellzahl entspricht der Untersuchung von Defontis et al. (2011) und lässt darauf schließen, dass die erzielten Ergebnisse repräsentativ sind.

Die Zahl der nachgewiesenen Erythrozyten war knapp nicht signifikant vom Entnahmesystem abhängig. Bourke et al. (1997) konnte ebenfalls lediglich eine Tendenz feststellen, dass mehr rote Blutkörperchen mit einem Zytologiebürstchen als mit einem Baumwolltupfer im Ausstrich nachgewiesen werden können. Jedoch stehen die Erkenntnisse der vorliegenden Studie im Widerspruch zu der Erkenntnis von Neuberg (2009). Dieser konnte nachweisen, dass im Vergleich der beiden Entnahmesysteme CytologyBrush® und Uteruskulturtupfer, der CytologyBrush® signifikant mehr Erythrozyten im Ausstrich liefert. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bei der erwähnten Untersuchung die Erythrozyten nur geschätzt wurden und jeweils beide Entnahmesysteme verwendet wurden. Hierbei könnte eine iatrogene Reizung des Endometriums durch das erste Entnahmesystem zu einem vermehrten Nachweis von Erythrozyten durch das zweite System zur Folge haben. Auf Grund dessen wird der eigenen Untersuchung eine höhere Aussagekraft zugesprochen.

### 5. 3. 2 Zusammenhang zwischen dem hormonellen Status und dem Ergebnis der exfoliativen Endometriumszytologie

Es konnte eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel und der Gesamtzellzahl im zytologischen Ausstrich sowohl in der multiplen linearen Regression ( $p = 0,05$ ) als auch in der linearen Regression ( $p = 0,001$ ) gezeigt werden.

Hierbei wurde mit der linearen Regression festgestellt, dass eine Verdoppelung des Östradiol-17- $\beta$ -Spiegels eine Erhöhung der Gesamtzellzahl im Ausstrich um den Faktor 1,25 bewirkt.

In der multiplen linearen Regression werden weitere Faktoren, wie z. B. das Alter, der Progesteronspiegel oder der Grad der Uterusödematierung in der Berechnung berücksichtigt. Dagegen wird in der linearen Regression nur der Zusammenhang zwischen dem Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel und der Gesamtzellzahl betrachtet. Dies kann den Unterschied der p-Werte der beiden Berechnung erklären.

Die Konzentration des wichtigsten Östrogens der Stute, Östradiol-17- $\beta$  (Handler und Aurich, 2009), beginnt sechs bis acht Tage vor der Ovulation anzusteigen und erreicht mit 10 bis 15 pg/ml (Ginther, 1992) zwei Tage *ante ovulationem* ein Maximum (Daels et al., 1991).

Während der Rosse weist das Endometrium der Stute ein sekretorisches Epithel auf (Tunón et al., 1995) und das Maximum der sekretorischen Aktivität wird gegen Ende des Östrus erreicht (Samuel

et al., 1979; Keenan et al., 1991). Bereits Walter et al. (2007) wiesen darauf hin, dass die Probenentnahme in der Rosse erfolgen sollte, da auf Grund der endometrialen Sekretion ausreichend Material für eine repräsentative Untersuchung des Endometriums entnommen werden kann. Diese Behauptung konnte in der vorliegenden Untersuchung erstmals rechnerisch belegt werden.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass eine positive Korrelation zwischen der Erythrozytenzahl und dem Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel besteht. Dies konnte sowohl mit der multiplen linearen Regression als auch der linearen Regression gezeigt werden.

Außerhalb des Puerperiums war bisher der Nachweis von Erythrozyten während einer akuten Endometritis (Digby, 1978; Couto und Hughes, 1984; Brook, 1985), als Folge eines uterinen Traumas (Digby, 1978; Brook, 1993) oder einer kapillären Instabilität beschrieben worden (Couto und Hughes, 1984). Eine kapilläre Instabilität tritt als Folge einer physiologischen Hyperämie der Geschlechtsorgane auf (Couto und Hughes, 1984) und wird durch den erhöhten Östrogenspiegel während der Rosse verursacht (Tunón et al., 1995). Unter gesteigertem Östrogeneinfluss konnte eine Instabilität der Kapillaren bei Ratten bereits belegt werden (Schechter et al., 1987). Auf Grund des uterinen Ödems weitet sich der Interzellularabstand während der Rosse auf (Tunón et al., 1995), was einen Übertritt von Erythrozyten aus dem Interstitium in das Lumen der Gebärmutter erleichtern könnte.

Desweiteren konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel und der Endometriumzellzahl festgestellt werden. Auf Grund der berechneten Korrelation zwischen dem Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel und der Gesamtzellzahl, die vermutlich durch eine erhöhte endometriale Sekretion (Tunón et al., 1995; Walter und Wehrend, 2007) verursacht wird, wäre ein ähnlicher Zusammenhang dieser beiden Parameter zu erwarten gewesen. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass der Zusammenhang zwischen der Gesamtzellzahl und dem Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel lediglich durch die Erythrozytenzahl und nicht durch eine Veränderung der Endometriumzellzahl hervorgerufen wird.

Desweiteren konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Progesteronspiegel und der Gesamtzell-, Endometriumzell- oder der Erythrozytenzahl dargestellt werden. Somit beeinflusst der Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel stärker die zelluläre Zusammensetzung der exfoliativen Endometriumszytologie als der Progesteronspiegel.

Da die Progesteronwerte nahezu alle unter dem Basalwert von 1 ng/ml lagen, sollten weitere Untersuchungen erfolgen um den Zusammenhang zwischen dem Progesteronspiegel und der zellulären Zellzusammensetzung der exfoliativen Endometriumszytologie genauer zu untersuchen.

### 5. 3. 3 Zusammenhang zwischen Zellzahl, der Anamnese, dem Uterusödem und dem Abstand zwischen Probenentnahme und Geburt bzw. Ovulation

Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Gesamt-, Endometrium- oder Erythrozytenzahl und dem Abstand zwischen Probenentnahme und letzter Geburt festgestellt werden.

Lediglich vier Stuten wurden in der Fohlenrosse untersucht, der kürzeste Abstand zwischen Probenentnahme und Geburt betrug neun Tage, wobei der Abstand im Schnitt  $154,70 \pm 174,98$  Tage (Median: 28,50) betrug. Dies bedeutet, dass der Großteil der exfoliativen Endometriumszytologien außerhalb des Puerperiums entnommen wurden, weil die histologischen Veränderungen des Endometriums bereits 14 Tage p. p. (Gygax et al., 1979) abgeschlossen sind.

Im Durchschnitt hatten Endometriumzellen mit  $92 \pm 55,21$  Zellen (Median: 78) den größten Anteil an der Zellpopulation im Ausstrich, gefolgt von den Erythrozyten (Durchschnitt:  $20,26 \pm 49,64$  Zellen; Median: 3,00) und den neutrophilen Granulozyten (Durchschnitt:  $0,45 \pm 3,76$  Zellen; Median: 0,00).

Die gewonnen Erkenntnisse bestätigen das Resultat von Belz et al. (1995), dass ab dem neunten Tag p. p. Endometriumzellen die dominierende Zellpopulation im zytologischen Ausstrich darstellen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass außerhalb des Puerperiums die Anzahl der verschiedenen Zelltypen unabhängig vom Abstand zur letzten Geburt ist.

Desweiteren konnte statistisch kein Zusammenhang zwischen der Gesamt-, Endometrium- oder Erythrozytenzahl und dem Abstand der Probenentnahme und der Ovulation festgestellt werden. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass eine Ovulationsinduktion durchgeführt wurde. Auf Grund der eindeutigen Ergebnisse und dem Zeitpunkt der Induktion ist davon auszugehen, dass dies keinen Einfluss auf die Resultate hatte.

Das uterine Ödem wird durch einen erhöhten Östrogen- und einen basalen Progesteronwert verursacht (Hayes et al., 1985; Pycock et al., 1995; Pelehach et al., 2002). Also kann eine Ödematisierung des Uterus als Indikator für einen Östrogenspiegel über Basalniveau angesehen werden (Hayes et al., 1985). Pelech et al. (2002) konnten diesen Zusammenhang experimentell an ovariectomierten Stuten bestätigen. Jedoch konnten Studien zeigen, dass kein Zusammenhang zwischen der Höhe des absoluten Östrogenspiegels und dem Grad des Uterusödems besteht (Pycock et al., 1995; Pelehach et al., 2002).

Durch die in der vorliegenden Studie fehlende Korrelation zwischen der Gesamt-, Endometrium- oder Erythrozytenzahl und dem Grad des Uterusödems, lässt sich der oben nicht gegebene

Zusammenhang bestätigen. Ansonsten wäre eine vergleichbare Wechselbeziehung, wie zwischen der Gesamtzellzahl-, Erythrozytenzahl und dem Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel bzw. eine knapp nicht mehr signifikante Korrelation zwischen der Endometriumzellzahl und dem Östradiol-17- $\beta$ -Spiegel zu erwarten gewesen.

Ebenfalls konnte statistisch keine Korrelation zwischen dem Alter der Stuten und der zellulären Zusammensetzung der exfoliativen Endometriumszytologie ermittelt werden.

Die Untersuchung zwischen Parität und Endometriumzellzahl konnte einen signifikant negativen Zusammenhang dieser beiden Parametern nachweisen, wobei eine Abnahme der Endometriumzellzahl um 6 % pro Geburt festgestellt wurde. Da kein Zusammenhang zwischen Alter oder Abstand zwischen der Probenentnahme und der letzten Geburt und dem Resultat der exfoliativen Endometriumszytologie besteht, lässt sich vermuten, dass mit zunehmender Parität eine Veränderung der Zell-Zellverbindungen im Uterus erfolgt und die Zellen schlechter durch das Entnahmesystem aufgenommen werden können.

Endometriumzellen sind sowohl lateral als auch basal durch *tight junctions*, Desmosomen (Tunón et al., 1995; Böttcher, 2011) und *gap junctions* miteinander verbunden (Day et al., 1998), wobei sich der laterale Interzellularabstand in der Rosse auf Grund des uterinen Ödems vergrößert (Tunón et al., 1995).

In einer Studie von Wilsher et al. (2003) konnte in einem Vergleich der Mikrokotyledonenfläche der Plazenta bei Stuten, eine Reduktion der Mikrokotyledonenfläche bei multiparen Stuten festgestellt werden. Die Autoren konnten eine Veränderung der Zell-Zell-Verbindungen bei steigender Parität nicht ausschließen, obwohl Tunón et al. (1995) keinen Unterschied zwischen den Strukturen der Endometriumzellen beim Vergleich von Maidenstuten und Stuten, die bisher ein oder zwei Fohlen zur Welt gebracht hatten, feststellen konnten. Vermutlich wird dies durch die geringe Anzahl von Nachkommen der untersuchten Tiere verursacht und es sollten weitere Untersuchungen erfolgen, die Stuten mit mehr Fohlen einbeziehen.

#### 5. 3. 4 Einflussfaktoren auf die Etablierung einer Trächtigkeit

In der vorliegenden Untersuchung konnte kein Zusammenhang zwischen der Gesamt-, Endometriumzell- oder Erythrozytenzahl und der Etablierung einer Trächtigkeit festgestellt werden. Bisher wurden lediglich Anzeichen einer Endometritis, in Form von Zelldebris, neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten (Mattos et al., 1984; Brook, 1985; LaCour, 1985; Saltiel et al., 1987; Riddle et al., 2007) und nur zum Teil die Anzahl der Endometriumzellen und Erythrozyten (LaCour, 1985) mit der Konzeptionsrate verglichen. Hierbei konnten LaCour et al. (1985) einen quantitativ stärkeren Nachweis von Erythrozyten und schwächeren Nachweis von intakten

Endometriumzellen, bei gleichzeitig stärkeren Entzündungsanzeichen, mit einer Verminderung der Trächtigkeitsrate in Verbindung bringen.

Die erzielten Resultate bestätigen, dass die Anzahl der Endometriumzellen und Erythrozyten keinen Einfluss auf die Etablierung einer Trächtigkeit haben, sondern die Menge der nachgewiesenen Erythrozyten und Endometriumzellen nur in Kombination mit weiteren Entzündungsanzeichen als pathologisch und fertilitätsmindernd anzusehen ist.

Bei der Interpretation der Trächtigkeitsergebnisse ist zu beachten, dass sich die Resultate lediglich auf die Rosse beziehen, in welcher die Untersuchung und die Probenentnahme erfolgten. Also zeigen sie nicht das endgültige Trächtigkeitsergebnis am Ende der Decksaison an.

Neben der zellulären Zusammensetzung der exfoliativen Endometriumszytologie konnte in der vorliegenden Studie beobachtet werden, dass Daten der Anamnese, Uteruszysten und intrauterine Flüssigkeitsansammlungen einen Einfluss auf die Etablierung einer Trächtigkeit haben können.

Überraschenderweise war die Trächtigkeitsrate bei Stuten, die seit mehr als einem Jahr kein Fohlen mehr zur Welt gebracht hatten, besser, als bei Stuten mit Fohlen bei Fuß; gefolgt von Maidenstuten. In der Literatur wird beschrieben, dass bei Stuten mit Fohlen bei Fuß eine höhere Trächtigkeitsrate als bei Maidenstuten oder mehrjährig nicht besamten oder güsten Stuten zu erwarten ist (Riddle et al., 2007; Neuberg, 2009), da diese Tiere bereits eine erfolgreiche Belegung in der vorherigen Zuchtsaison bewiesen haben. In der vorliegenden Untersuchung kann die fehlende Unterscheidung in mehrjährig nicht besamte, güste und Stuten mit Trächtigkeitsproblemen diesen Zusammenhang beeinflussen, obwohl Neuberg (2009) keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Kategorisierung der untersuchten Stuten in die erwähnten Gruppen und der Etablierung einer Trächtigkeit feststellen konnte.

Die Reproduktionsleistung von Zuchtstuten kann durch Veränderungen, die nicht in der Routinediagnostik detektierbar sind, z. B. einer funktionell verminderten zervikalen Kompetenz, hormonellen Imbalancen oder Störungen des Endometriums vermindert werden (LeBlanc, 2008). Bereits Neuberg (2009) vermutete, dass besonders ältere Maidenstuten auf Grund solcher Veränderungen eine niedrigere Trächtigkeitsrate aufweisen könnten.

Die verminderte Trächtigkeitsrate bei Stuten, die intrauterine Zysten aufwiesen, deckt sich mit Beschreibungen in der Literatur (Wilson, 1985; Bracher et al., 1992; Tannus und Thun, 1995; Neuberg, 2009). Zysten des Endometriums stellen zwar kein absolutes Hindernis für die Etablierung und Aufrechterhaltung einer Trächtigkeit dar, aber die Fähigkeit der Etablierung einer Trächtigkeit kann bei betroffenen Stuten deutlich erniedrigt sein (Bracher et al., 1992; Tannus und

Thun, 1995; Aurich und Palm, 2009). Der klinische Einfluss von Endometriumszysten ist abhängig von deren Lage, Größe und deren Anzahl (Wilson, 1985), wobei Adams et al. (1987) der Meinung sind, dass ein negativer Einfluss auf die Abfohlrate ab mehr als fünf Zysten zu erwarten ist.

Die Verlegung des Passageweges der Spermatozoen (Bartmann et al., 1997) oder eine gestörte intrauterine Migration des Embryos (Ginther, 1983) sind mögliche Ursachen für eine verminderte Fertilität. Der zuletzt erwähnte Aspekt kann ein Ausbleiben bzw. eine mangelhafte Erkennung des frühembryonalen Signals und eine Luteolyse zur Folge haben (McDowell et al., 1988). Hinzu kommt, dass Endometriumszysten die potentielle maternale Kontaktfläche herabsetzen bzw. das Epithel im Bereich der Zysten nicht ausreichend differenziert ist und dadurch eine effektive Versorgung des Konzeptus nicht gegeben ist (Leidl et al., 1987).

In der Literatur werden neben uterinen Zysten auch das Vorliegen von intrauterinen Flüssigkeitsansammlungen, die bereits vor der Ovulation vorhanden sind, als ein Faktor beschrieben, der die Etablierung einer Trächtigkeit negativ beeinflusst (Adams et al., 1987; McKinnon et al., 1988; Troedsson, 1999; Neuberger, 2009). Dieser Zusammenhang konnte in der vorliegenden Untersuchung bestätigt werden.

Die Studien von Shilela et al. (2006) und Brinsko et al. (2003) konnten zeigen, dass bei Stuten, die präovulatorisch intrauterine Flüssigkeitsansammlungen aufwiesen, signifikant häufiger auch postovulatorisch Flüssigkeit in der Gebärmutter zu finden ist. Darüber hinaus sind Brisko et al. (2003) der Meinung, dass Stuten mit Flüssigkeitsansammlung von über zwei Zentimeter Durchmesser während der Rosse, eine "*post breeding induced endometritis*" entwickeln.

Die fertilitätsmindernden Ursachen von intrauterinen Flüssigkeitsansammlungen sind noch nicht hinreichend geklärt. Eine in vitro Studie von Mckinnon et al. (1988) hat gezeigt, dass intrauterine Flüssigkeit spermizid wirken kann. Reilas et al. (1997) konnten diese Kenntnisse in vivo jedoch nicht bestätigen.

Allerdings ist sicher, dass es bei entzündlichen Prozessen im Uterus bis zum fünften Tag nach der Belegung zu einem frühzeitigen Absterben des Embryos auf Grund eines resultierenden zytotoxischen Milieus kommt (Waites und Bell, 1982; Watson, 2000).

Bei für diese Krankheit empfänglichen Stuten wird die "*post breeding induced endometritis*" als ein häufigerer Grund für Infertilität als eine infektiös bedingte Entzündungen des Endometriums angesehen (Pycock, 2006).

Die Trächtigkeitsraten nach Verwendung von kryo- (53 %) und flüssigkonserviertem (54 %) Sperma war nahezu gleich. In früheren Studien wurde eine niedrigere Konzeptionsrate mit tiefgefrorenem als mit flüssigkonserviertem Sperma beschrieben (Jasko et al., 1992; Vidament et

al., 1997; Sieme et al., 2003). Dies wird vor allem auf Schäden der Spermatozoen während des Gefrier- und Auftauvorgangs zurückgeführt (Amann und Pickett, 1987).

Im Gegensatz dazu konnte eine aktuelle Studie von Crowe et al. (2008) mit insgesamt 251 Stuten während der Saison 2006 und 2007, wobei 139 Stuten mit kryokonserviertem und 112 Stuten mit flüssigkonserviertem Sperma besamt wurden, eine bessere Konzeptionsrate mit kryokonservierten als mit flüssigkonservierten Sperma aufzeigen (Tabelle 19).

Tabelle 19: Ergebnisse der Trächtigkeitsrate abhängig von der Konservierungsart des Spermas und der Gesamtkonzeptionsrate pro Decksaison bzw. Zyklus im Vergleich (Crowe et al., 2008)

	<b>Kryokonserviert</b>	<b>Flüssigkonserviert</b>
<b>Decksaison</b>	82,0 %	69,6 %
<b>Zyklus</b>	59,1 %	44,0 %

Dabei ist zu beachten, dass Besamungen mit kryokonserviertem Samen sowohl prä- als auch postovulatorisch und mit flüssigkonservierten Sperma nur präovulatorisch erfolgten (Crowe et al., 2008). Durch eine zweifache Besamung konnte vermutlich eine derartig hohe Konzeptionsrate mit kryokonserviertem Sperma erreicht werden.

In der vorliegenden Studie wurde bei allen Stuten die Ovulation mit einer rektal ultrasonographischen Untersuchung kontrolliert.

Nach der Ovulationsinduktion, durch eine intravenöse Verabreichung von 3000 I. E. hCG (Ovogest<sup>®</sup> 1000 IE/ml, Fa. Intervet Unterschleißheim), wurde ein zwölfstündiges Untersuchungsintervall eingehalten. Zur exakten Ermittlung des Ovulationszeitpunktes wurde das Intervall nach 36 Stunden auf zwei Stunden verkürzt. Die Insemination erfolgte post ovulationem.

Durch dieses Management konnte eine möglichst ovulationsnahe Besamung erfolgen und vermutlich die vergleichsweise hohe Konzeptionsrate von kryokonserviertem zu flüssigkonserviertem Sperma erreicht werden.



## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser Untersuchung war festzustellen, ob die Anzahl der Endometriumzellen und Erythrozyten in der exfoliativen Endometriumszytologie durch den Abstand der Probenentnahme zur letzten Geburt bzw. Ovulation, das Alter der Stuten, die Parität, dem Uterusödem, dem Progesteron- bzw. Östradiol-17 $\beta$ -Spiegel und dem Entnahmesystem (Uteruskulturtupfer und CytologyBrush<sup>®</sup>) beeinflusst werden. Hierfür wurde jeder Stute mit einem Entnahmesystem eine intrauterine Zellprobe entnommen und die Endometrium-, Erythrozyten-, die Gesamtzellzahl und die Anzahl der neutrophilen Granulozyten bestimmt.

Des Weiteren sollte die vorliegende Untersuchung überprüfen, ob die Endometriumzell-, Erythrozyten- oder Gesamtzellzahl in der exfoliativen Endometriumszytologie die Etablierung einer Trächtigkeit beeinflusst.

Die Trächtigkeitsuntersuchung erfolgte ultrasonographisch zwischen dem 16. und 20. Tag nach der Besamung.

Folgende Resultate konnten erzielt werden.

- Es konnte gezeigt werden, dass der CytologyBrush<sup>®</sup> hoch signifikant mehr Zellen im Ausstrich lieferte als der Uteruskulturtupfer.
- Mit Hilfe des CytologyBrush<sup>®</sup> konnten in der exfoliativen Endometriumszytologie hoch signifikant mehr Endometriumzellen als mit dem Uteruskulturtupfer nachgewiesen werden.
- Die Anzahl der Erythrozyten war knapp nicht signifikant vom Entnahmesystem abhängig.
- Es konnte ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen dem Östradiol-17 $\beta$ -Spiegel und der Gesamtzellzahl im Ausstrich gezeigt werden. Hierbei war mit Hilfe der linearen Regression eine Zunahme der Zellen um den Faktor 1,25 bei einer Verdoppelung des Östradiol-17 $\beta$ -Spiegels zu erkennen.
- Der Zusammenhang zwischen der Endometriumzellzahl und dem Östradiol-17 $\beta$ -Spiegel war knapp nicht signifikant.
- Zwischen der Erythrozytenzahl und dem Östradiol-17 $\beta$ -Spiegel bestand eine hoch signifikant positive Korrelation, wobei die lineare Regression eine Erhöhung dieses Zelltyps im Ausstrich um den Faktor 2,57 bei einer Verdoppelung des Östradiol-17 $\beta$ -Spiegels anzeigte.
- Es lag kein Zusammenhang zwischen dem Progesteronspiegel und der Gesamtzell-, Endometriumzell- oder Erythrozytenzahl vor.

- Es lag ein signifikant negativer Zusammenhang zwischen der Endometriumzellzahl und der Parität vor, was eine Abnahme der Endometriumzellen im Ausstrich um 6 % pro Geburt zur Folge hatte.
- Kein Einfluss war zwischen der Gesamtzell- bzw. Erythrozytenzahl und der Parität zu erkennen.
- Keine Beziehung zwischen der Gesamt-, Endometrium- oder Erythrozytenzahl und dem Abstand der Probenentnahme und der letzten Geburt bzw. Ovulation, dem Uterusödem oder dem Alter der Stute konnte in dieser Untersuchung festgestellt.
- Die Gesamtzell-, Endometriumzell- oder Erythrozytenzahl beeinflusste die Etablierung einer Trächtigkeit nicht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Rosse der ideale Zeitpunkt für die Entnahme der exfoliativen Endometriumszytologie ist, da die Gesamt- und Erythrozytenzahl durch einen Anstieg des Östradiol-17 $\beta$ -Spiegels positiv beeinflusst wird und der CytologyBrush<sup>®</sup> die meisten Endometriumzellen im Ausstrich liefert.

Weder die Gesamtzellzahl, Endometriumzellzahl noch die Erythrozytenzahl beeinflussen die Etablierung einer Trächtigkeit.

## 7 Summary

The aim of this study was to determine whether the number of endometrial cells and erythrocytes in uterine cytology are influenced by age, parity, degree of uterine edema, interval between sampling and foaling, interval between sampling and ovulation, progesterone level, estradiol-17 $\beta$  level and sampling system (uterus culture swabs and CytologyBrush<sup>®</sup>). For this purpose only one sampling system was used on each mare to take an uterine cytological sample and the number of endometrial cells, erythrocytes, neutrophil granulocytes and total number of cells were determined.

Furthermore, this present study was to examine whether the number of endometrial cells, red blood cells or total number of cells influence pregnancy rate. Gestation examination was performed between 16 and 20 days after insemination.

The following results were documented:

- CytologyBrush<sup>®</sup> detected a significantly higher number of total cells than uterus culture swabs.
- CytologyBrush<sup>®</sup> delivered high significantly more endometrial cells than uterine culture swabs.
- There was no correlation between sampling system and number of erythrocytes.
- There was a significant positive correlation between estradiol-17 $\beta$  level and total number of cells. Doubling estradiol-17 $\beta$  level caused an increase of cells by factor 1.25.
- The relationship between number of endometrial cells and estradiol-17 $\beta$  level was marginally not significant.
- There was a high significant positive correlation between number of erythrocytes and estradiol-17 $\beta$  level. Linear regression showed, that doubling estradiol-17 $\beta$  level caused an increase of red blood cells by factor 2.57.
- Progesterone level did neither influence total number of cells nor number of endometrial cells nor number of erythrocytes
- A significant negative correlation between number of endometrial cells and parity could be detected, resulting in a decrease of this cell type of 6 % per birth.
- There was no relation between parity and total number of cells or erythrocytes.

### Summary

- No correlation between total number of cells, endometrial cells or red blood cells and interval between sampling and foaling, interval between sampling and ovulation, degree of uterine edema, and age was found in this study.
- Neither total number of cells nor number of endometrial cells nor number of erythrocytes had an influence on pregnancy rate.

In summary, it should be noted that heat is the ideal moment for sampling endometrial cytology. Total number of cells and number of erythrocytes were positively influenced by an increasing estradiol-17 $\beta$  level. CytologyBrush<sup>®</sup> delivered more endometrial cells than uterus culture swabs. Neither total number of cells nor number of endometrial cells nor number of erythrocytes could affect pregnancy rate.

## 8 Literaturverzeichnis

**Adams GP, Kastelic JP, Bergfelt DR, Ginther OJ (1987)**

Effect of uterine inflammation and ultrasonically-detected uterine pathology on fertility in the mare.

Journal of Reproduction and Fertility. Supplement 35: S. 445–454.

**Aguilar J, Hanks M, Shaw DJ, Else R, Watson E (2006)**

Importance of using guarded techniques for the preparation of endometrial cytology smears in mares.

Theriogenology 66: S. 423–430.

**Alghamdi AS, Foster DN, Troedsson MHT (2004)**

Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri.

Reproduction (Cambridge, England) 127: S. 593–600.

**Amann R, Pickett B (1987)**

Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa.

Journal of Equine Veterinary Science 7: S. 145–173.

**Aurich C (2011)**

Reproductive cycles of horses.

Animal Reproduction Science 124: S. 220–228.

**Aurich C, Palm F (2009)**

Erkrankungen von Vulva, Vagina, Zervix, Uterus und Eileiter

In: Aurich, Christine (Hrsg.): Reproduktionsmedizin beim Pferd - Gynäkologie, Andrologie, Geburtshilfe.

Parey, 2. Aufl., Stuttgart, S. 81–104.

**Aurich JE (2009)**

Erkrankungen im Puerperium, Geburtsverletzungen und deren Operationen

In: Aurich, Christine (Hrsg.): Reproduktionsmedizin beim Pferd - Gynäkologie, Andrologie, Geburtshilfe.

Parey, 2. Aufl., Stuttgart, S. 209 - 223.

**Bach L (1973)**

Exfoliative cytology of peritoneal fluid in the horse.  
Veterinary Annual 13: S. 102–109.

**Bae S, Watson ED (2003)**

A light microscopic and ultrastructural study on the presence and location of oxytocin in the equine endometrium.  
Theriogenology 60: S. 909–921.

**Bailey JV, Bristol FM (1983)**

Uterine involution in the mare after induced parturition.  
American Journal of Veterinary Research 44: S. 793–797.

**Ball BA, Shin SJ, Patten VH, Lein DH, Woods GL (1988)**

Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mares endometrium.  
Theriogenology 29: S. 1269–1283.

**Baranski W, Podhalicz-Dziegielewska M, Zdunczyk S, Janowski T (2012)**

The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds.  
Theriogenology 78: S. 1939–1947.

**Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW (2008)**

A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle.  
Theriogenology 69: S. 714–723.

**Bartmann CP, Schöning A, Brickwedel I, Ohnesorg B, Klug E (1997)**

Hysteroskopie und minimal invasive endouterine Chirurgie bei der Stute.  
Pferdeheilkunde 13: S. 474–482.

**Belz JP, Glatzel PS (1995)**

Fruchtbarkeit bei Stuten nach gestörtem bzw. ungestörtem Puerperium. Aussagekraft histologischer und zytologischer Untersuchungen des Uterus.  
Tierärztliche Praxis 23: S. 267–272.

**Blanchard TL, Garcia MC, Hurtgen JP, Kenney RM (1981)**

Comparison of two techniques for obtaining endometrial bacteriologic cultures in the mare.  
Theriogenology 16: S. 85–93.

**Böttcher D (2011)**

Morphologisch-funktionelle Charakterisierung equiner endometrialer Epithel und Stromazellen  
in Monokultur unter Einbeziehung immunzytologischer und transmissionselektronenmikroskopi-  
scher Methoden

Diss. med. vet., Universität Leipzig, S. 132.

**Bourke M, Mills JN, Barnes AL (1997)**

Collection of endometrial cells in the mare.  
Australian Veterinary Journal 75: S. 755–758.

**Bracher V, Mathias S, Allen WR (1992)**

Videoendoscopic evaluation of the mare's uterus: 2. Findings in subfertile mares.  
Equine Veterinary Journal 24: S. 279–284.

**Brinsko SP, Rigby SL, Varner DD, Blanchard TL (2003)**

A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis  
Proceedings of the 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practition-  
ers, New Orleans, Louisiana, USA, 21-25 November 2003: S. 363–365.

**Britton BA (1982)**

Endometrial change in the annual reproductive cycle of the mare.  
Journal of Reproduction and Fertility. Supplement 32: S. 175–180.

**Brook D (1985)**

Cytological and bacteriological examination of the Mare's endometrium.  
Journal of Equine Veterinary Science 5: S. 16–22.

**Brook D (1993)**

28. Uterine Cytology  
In: McKinnon, A. O., Voss, J. L. (Hrsg.): Equine Reproduction.  
Lea & Febiger, 1. Auflage, London, S. 246-254.

**Card C (2005)**

Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares.  
Theriogenology 64: S. 580–588.

**Cary W (1943)**

A method of obtaining endometrial smears for study of their cellular content.  
American Journal of Obstetrics and Gynecology 46: S. 422-424.

**Cocchia N, Paciello O, Auletta L, Uccello V, Silvestro L, Mallardo K, Paraggio G, Pasolini MP (2012)**

Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares.  
Theriogenology 77: S. 89–98.

**Conboy HS (1978)**

Diagnosis and therapy of equine endometritis.  
Proceedings of the annual Convention of the American Association of equine Practitioners 24: S. 165–171.

**Couto GB, Vaillancourt DH, Lefebvre RC (2013)**

Comparison of a leukocyte esterase test with endometrial cytology for diagnosis of subclinical endometritis in postpartum dairy cows.  
Theriogenology 79: S. 103–107.

**Couto MA, Hughes JP (1984)**

Technique and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare.  
Journal of Equine Veterinary Science 4: S. 265–273.

**Couto MA, Hughes JP (1985)**

Intrauterine inoculation of a bacteria-free filtrate of streptococcus zooepidemicus in clinically normal and infected mares.  
Journal of Equine Veterinary Science 5: S. 81–86.

**Crickman JA, Pugh DG (1986)**

Equine endometrial cytology - A review of techniques and interpretations.  
Veterinary Medicine 81: S. 650–656.



**Crowe CA, Ravenhill PJ, Hepburn RJ, Shepherd CH (2008)**

A retrospective study of artificial insemination of 251 mares using chilled and fixed time frozen-thawed semen

Equine Veterinary Journal 6: S. 572-576

**Daels PF, Ammon DC, Stabenfeldt GH, Liu IK, Hughes JP, Lasley BL (1991)**

Urinary and plasma estrogen conjugates, estradiol and estrone concentrations in nonpregnant and early pregnant mares.

Theriogenology 35: S. 1001–1017.

**Dascanio J (2003)**

Endometrial cytology

In: Robinson, N.E. (Hrsg.): Current Therapy in Equine Medicine, 5. Auflage.

Saunders, Philadelphia, S. 226 - 228.

**Dascanio JJ, Parker NA, Ley WB, Bailey TL, Purswell BJ, Bowen JM, Digraessie WA (1997)**

Diagnostic procedures in mare reproduction: Uterine evaluation, hysteroscopy, oviductal patency, and scintigraphy.

Compendium on continuing education for the practicing veterinarian 19: S. 182–186.

**Davies Morel MCG (2008)**

3. Control of reproduction in the mare

In: Davies Morel, M. C. G. (Hrsg.): Equine reproductive physiology, breeding, and Stud Managment, 3rd Edition, CABI Publishing, Wallingford, S. 28-39.

**Day WA, Bowen JA, Barhoumi R, Bazer FW, Burghardt RC (1998)**

Endometrial connexin expression in the mare and pig: Evidence for the suppression of cell-cell communication in uterine luminal epithelium.

The Anatomical Record 251: S. 277–285.

**Defontis M, Vaillancourt D, Grand FX (2011)**

Comparison of three methods of sampling for endometrial cytology in the mare. Preliminary study.

Tierärztliche Praxis Ausgabe Großtiere Nutztiere 39: S. 171–175.

**Digby NJ (1978)**

The technique and clinical application of endometrial cytology in mares.

Equine Veterinary Journal 10: S. 167–170.

**Do Ferreira CA (1957)**

Diagnosis of ovulation by means of endometrial cytology.  
Anais brasileiros de ginecologia 43.

**Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ (2010)**

Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows.  
Journal of Dairy Science 93: S. 5225–5233.

**Ehlers JP (2000)**

Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Vaginalzytologie bei der Hündin und ihr Einsatz bei der Bestimmung des optimalen Belegungszeitraumes. Diss. med. vet., Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

**Freeman KP, Roszel JF, Slusher SH (1986)**

Equine Endometrial Cytologic Smear Patterns.  
Compendium on continuing education for the practicing veterinarian 8: S. 349-359.

**Ginther OJ (1983)**

Mobility of the early equine conceptus.  
Theriogenology 19: S. 603–611.

**Ginther OJ (1992)**

6. Characteristics of the ovulatory season  
In: Ginther, O. J. (Hrsg.): Reproductive biology of the mare, basic and applied aspects, 2. Auflage, Equiservices, Cross Plains, Wisconsin, S. 173-232.

**Gomez-Cuetara C, Flores JM, Sanchez J, Rodriguez A, Sanchez MA (1995)**

Histological changes in the uterus during postpartum in the mare.  
Anatomia, histologia, embryologia 24: S. 19–23.

**Gygax AP, Ganjam VK, Kenney RM (1979)**

Clinical, microbiological and histological changes associated with uterine involution in the mare.  
Journal of Reproduction and Fertility. Supplement: S. 571–578.

**Handler J, Aurich JE (2009)**

2. Physiologie des Sexualzyklus der Stute  
In: Aurich, C. (Hrsg.): Reproduktionsmedizin beim Pferd; Gynäkologie - Andrologie - Geburtshilfe, 1. Auflage, Parey-Verlag, Stuttgart, 15-29.

**Hayes KE, Pierson RA, Scraba ST, Ginther OJ (1985)**

Effects of estrous cycle and season on ultrasonic uterine anatomy in mares.  
Theriogenology 24: S. 465–477.

**Hecht EL (1952)**

The value of the endometrial smear in the detection of malignancy.  
New York State Journal of Medicine 52: S. 2745–2752.

**Hjersing M, Holm E, Larsson G (1991)**

Comparison between Cytobrush and Papaplast in sampling vaginal smears.  
Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica 70: S. 595–599.

**Hoffmann B, Höveler R, Hasan SH, Failing K (1992)**

Ovarian and pituitary function in dogs after hysterectomy.  
Journal of Reproduction and Fertility 96: S. 837–845.

**Hoffmann B, Kyrein HJ, Ender ML (1973)**

An efficient procedure for the determination of progesterone by radioimmunoassay applied to bovine peripheral plasma.  
Hormone Research 4: S. 302–310.

**Hughes JP (1980)**

Clinical examination and abnormalities in the mare  
In: Morrow, David A. (Hrsg.): Current therapy in theriogenology.  
Saunders, Philadelphia, S. 706 - 721.

**Jasko DJ, Moran DM, Farlin ME, Squires EL, Aman RP, Pickett BW (1992)**

Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed stallion semen. Proceedings of the 38th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Orlando, Florida, 1992, S. 649–60.

**Katila T (1988)**

Histology of the post partum equine uterus as determined by endometrial biopsies.  
Acta Veterinaria Scandinavica 29: S. 173–180.

**Katila T (1995)**

Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after Insemination with fresh se-

men.

Biology of Reproduction Mono 1: Equine Reproduction: S. 515–517.

**Katila T (1996)**

Uterine defence mechanisms in the mare.

Animal Reproduction: Research and Practice 42: S. 197–204.

**Katila T, Koskinen E, Oijala M, Parviainen P (1988)**

Evaluation of the post-partum mare in relation to foal heat breeding .2. Uterine swabbing and biopsies.

Journal of Veterinary Medicine Series A-Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A-Physiology Pathology Clinical Medicine 35: S. 331–339.

**Keenan LR, Forde D, McGeady TA, Quinn PJ, Roche JF (1991)**

Ultrastructure of the endometrium of mares in anestrus, estrus, diestrus and early-pregnancy.

Journal of Reproduction and Fertility: S. 695–696.

**Kenney RM (1978)**

Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death.

Journal of the American Veterinary Medical Association 172: S. 241–262.

**Klein C, Lottner S, Huchzermeyer SWR, Wehrend A (2009)**

Untersuchungen zur mikrobiellen Barrierefunktion des Hymenarings und der Zervix bei der Stute.

Tierärztliche Praxis: S. 113–117.

**Klein R, Schams D, Failing K, Hoffmann B (2003)**

Investigations on the re-establishment of the positive feedback of oestradiol during anoestrus in the bitch.

Reproduction in Domestic Animals 38: S. 13–20.

**Knudsen O (1964)**

Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares.

The Cornell Veterinarian 54: S. 415–422.

**Knudsen O (1982)**

A combined cytologic and bacteriologic endometrial examination in the mare.

Proceedings of the annual Convention of the American Association of equine Practitioners 28: S. 431–433.

**Kotilainen T, Huhtinen M, Katila T (1994)**

Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus.  
Theriogenology 41: S. 629–636.

**LaCour AST (1985)**

Relationship of endometrial cytology and fertility in the broodmare.  
Equine Practice - Reproduction 5: S. 28–32.

**LeBlanc MM (2008)**

When to refer an infertile mare to a theriogenologist.  
Theriogenology 70: S. 421–429.

**LeBlanc MM (2011)**

204. Uterine Cytology  
In: Angus O. McKinnon, Edward L. Squires Wendy E. Vaala Dickson D. Varner (Hrsg.): Equine Reproduction Ltd.  
Wiley-Blackwell, Second Edition, Oxford, S. 1922-1928.

**LeBlanc MM, Magsig J, Stromberg AJ (2007)**

Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares.  
Theriogenology 68: S. 403–412.

**Lefranc A, Allen WR (2007)**

Influence of breed and oestrous cycle on endometrial gland surface density in the mare.  
Equine Veterinary Journal 39: S. 506–510.

**Leidl W, Kaspar B, Kähn W (1987)**

Endometriumzysten bei Stuten. Teil 2. Klinische Untersuchungen: Vorkommen und Bedeutung.  
Tierärztliche Praxis 15: S. 281–289.

**Ley WB (1986)**

Additional tips for endometrial Cytology in mares.  
Veterinary Medicine 81: S. 894.

**Ley WB, Digraessie WA, Holyoak GR, Slusher SH (2001)**

Endometrium

In: Cowell, R. L.; Tyler R. D. (Hrsg.): Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse.  
Mosby, 2nd Edition, St Louis, Missouri, S. 180 - 186.

**Liu IK (1988)**

Uterine defense mechanisms in the mare.  
The Veterinary Clinics of North America 4: S. 221–228.

**Löfstedt RM (2011)**

180. Diestrus  
In: Angus O. McKinnon, Edward L. Squires Wendy E. Vaala Dickson D. Varner (Hrsg.): Equine  
Reproduction Ltd.  
Wiley-Blackwell, Second Edition, S. 1728- 1731.

**Mattos RC, Mattos AL, Gunzel AR, Klug E (1984)**

Bacteriological and cytological examinations of uterus swabs from the horse.  
Der Praktische Tierarzt 65: S. 809–813.

**McCue MP, Scoggin FC, Lindholm ARG (2011)**

179. Estrus  
In: Angus O. McKinnon, Edward L. Squires Wendy E. Vaala Dickson D. Varner (Hrsg.): Equine  
Reproduction Ltd.  
Wiley-Blackwell, Second Edition, Oxford, S. 1719-1727.

**McDowell KJ, Sharp DC, Grubaugh W, Thatcher WW, Wilcox CJ (1988)**

Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares.  
Biology of Reproduction 39: S. 340–348.

**McKinnon AO, Squires EL, Harrison LA, Blach EL, Shideler RK (1988)**

Ultrasonographic studies on the reproductive tract of mares after parturition: effect of involution  
and uterine fluid on pregnancy rates in mares with normal and delayed first postpartum ovulatory  
cycles.  
Journal of the American Veterinary Medical Association 192: S. 350–353.

**Neuberg K (2009)**

Einsatz der exfoliativen Endometriumszytologie bei Zuchtstuten unter Praxisbedingungen  
Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen.  
VVB Laufersweiler, 1. Aufl., Giessen.

**Nielsen JM (2005)**

Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy.  
Theriogenology 64: S. 510–518.

**Nielsen JM, Nielsen FH, Petersen MR (2012)**

Diagnosis of equine endometritis - Microbiology, cytology and histology of endometrial biopsies and the correlation to fertility.  
Pferdeheilkunde 28: S. 8–13.

**Overbeck W, Witte TS, Heuwieser W (2011)**

Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares.  
Theriogenology 75: S. 1311–1318.

**Pelehach LM, Greaves HE, Porter MB, Desvousges A, Sharp DC (2002)**

The role of estrogen and progesterone in the induction and dissipation of uterine edema in mares.  
Proceedings of the 8th International Equine Reproduction Symposium on equine Reproduction  
58: S. 441–444.

**Purswell BJ, Ley WB, Sriranganathan N, Bowen JM (1989)**

Aerobic and anaerobic bacterial flora in the postpartum mare.  
Journal of Equine Veterinary Science 9: S. 141–144.

**Pycock JF (2006)**

How to maximize the chances of breeding successfully from the older maiden mare.  
Proceeding of the American Association of Equine Practitioners 52: S. 245–249.

**Pycock JF, Allen WE, Newcombe, JR (1988)**

Use of real-time ultrasonography to detect uterine pathology in the mare.  
British Journal of Radiology 61: S. 551–552.

**Pycock JF, Dieleman S, Drifjhout P, Brug Y, Oei C, Weijden GC (1995)**

Correlation of plasma concentrations of progesterone and oestradiol with ultrasound characteristics of the uterus and duration of oestrous behaviour in the cycling mare.  
Reproduction in Domestic Animals 30: S. 224–227.

**Reilas T, Katila T, Mäkelä O, Huhtinen M, Koskinen E (1997)**

Intrauterine fluid accumulation in oestrous mares.

Acta Veterinaria Scandinavica 38: S. 69–78.

**Reinemund B (1988)**

Vergleichende Untersuchungen zur Klinik, Zytologie, Bakteriologie und Histologie der Endometritis bei der Stute unter Berücksichtigung parenteraler und intrauteriner Behandlungsverfahren.

Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen.

**Ricketts SW, Mackintosh ME (1987)**

Role of anaerobic bacteria in equine endometritis.

Journal of Reproduction and Fertility. Supplement 35: S. 343–351.

**Riddle WT, LeBlanc MM, Stromberg AJ (2007)**

Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a thoroughbred practice.

Theriogenology 68: S. 395–402.

**Romberg GH (1954)**

Endometrial aspiration smears in the study of infertility.

Fertility and Sterility 5: S. 52–67.

**Roszel JF, Freeman KP (1988)**

Equine endometrial cytology.

The Veterinary Clinics of North America. Equine practice 4: S. 247–262.

**Rozeboom KJ, Troedsson MH, Hodson HH, Shurson GC, Crabo BG (2000)**

The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine.

Journal of Animal Science 78: S. 443–448.

**Saltiel A, Gutierrez A, Buen-Llado N de, Sosa C (1987)**

Cervico-endometrial cytology and physiological aspects of the post-partum mare.

Journal of Reproduction and Fertility. Supplement 35: S. 305–309.

**Samper JC (2010)**

A review of a practitioner's perspective on endometrial edema.

Pferdeheilkunde 26: S. 14–18.



**Samuel CA, Ricketts SW, Rossdale PD, Steven DH, Thurley KW (1979)**

Scanning electron microscope studies of the endometrium of the cyclic mare.  
Journal of Reproduction and Fertility. Supplement: S. 287–292.

**Schechter J, Ahmad N, Elias K, Weiner R (1987)**

Estrogen-induced tumors: changes in the vasculature in two strains of rat.  
The American Journal of Anatomy 179: S. 315–323.

**Schmidt AR (1988)**

Guarded right uterine horn lavage in the mare for bacteriology and cytology  
Diss. med. vet., Michigan State University.

**Schnorr B, Kressin M (2001)**

Embryologie der Haustiere  
15.1 Plazentation beim Pferd.  
Thieme, 4. Aufl., Stuttgart, S. 84 - 89.

**Schoon HA, Schoon D, Klug E (1992)**

Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute.  
Pferdeheilkunde 8: S. 355–362.

**Shilela A, Malschitzky E, Mattos AL, Garbade P, Mattos RC, Mattos RMG (2006)**

Effect of an intra-uterine fluid accumulation before and after the first postpartum ovulation on pregnancy rates in the mare.  
Pferdeheilkunde 17: S. 639–643.

**Shin SJ, Lein DH, Aronson AL, Nusbaum SR (1979)**

The bacteriological culture of equine uterine contents, in-vitro sensitivity of organisms isolated and interpretation.  
Journal of Reproduction and Fertility. Supplement: S. 307–315.

**Sieme H, Schäfer T, Stout TAE, Klug E, Waberski D (2003)**

The effects of different insemination regimes on fertility in mares.  
Theriogenology 60: S. 1153–1164.

**Slusher SH, Freeman KP, Roszel JF (1984)**

Eosinophils in equine uterine cytology and histology specimens.  
Journal of the American Veterinary Medical Association 184: S. 665–670.

**Solomon WJ, Schultz R H, Fahning ML (1972)**

A study of chronic infertility in the mare utilizing uterine biopsy, cytology and cultural methods.  
Proceedings of the American Association of Equine Practitioners: S. 55–68.

**Stanton ME (2011)**

235. Uterine Involution

In: Angus O. McKinnon, Edward L. Squires Wendy E. Vaala Dickson D. Varner (Hrsg.): Equine Reproduction Ltd.

Wiley-Blackwell, Second Edition, Oxford, S. 2291-2293

**Steven DH, Jeffcott LB, Mallon KA, Ricketts SW, Rossdale PD, Samuel CA (1979)**

Ultrastructural studies of the equine uterus and placenta following parturition.

Journal of Reproduction and Fertility. Supplement: S. 579–586.

**Tammer I, Blendinger K, Sobiraj A, Bostedt H (1994)**

Über den Einsatz der exfoliativen Vaginalzytologie im Rahmen der gynäkologischen Befunderhebung bei der Hündin.

Tierärztliche Praxis 22: S. 199–207.

**Tannus RJ, Thun R (1995)**

Influence of endometrial cysts on conception rate of mares.

Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A 42: S. 275–283.

**Tillmann H, Lauer J (1977)**

Die Zelldiagnostik bei symptomarmen Entzündungen der Genitalschleimhäute der Stute.

Tierärztliche Umschau 32: S. 376–380.

**Tillmann H, Meinecke B (1980)**

Die zytodiagnostische Interpretation der lokalen Abwehrreaktionen bei Genitalinfektionen der Stute.

Tierärztliche Praxis 8: S. 195–210.

**Trimbos JB, Arentz NP (1986)**

The efficiency of the Cytobrush versus the cotton swab in the collection of endocervical cells in cervical smears.

Acta cytologica 30: S. 261–263.

**Troedsson MH (1999)**

Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare.  
Theriogenology 52: S. 461–471.

**Troedsson MH, Liu IK, Crabo BG (1998)**

Sperm transport and survival in the mare: a review.  
Theriogenology 50: S. 807–818.

**Troedsson MH, Steiger BN, Ibrahim NM, King VL, Foster DN, Crabo BG (1995)**

Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare.  
Biology of Reproduction 52: S. 133.

**Tunón AM, Rodriguez-Martinez H, Haglund A, Albihn A, Magnusson U, Einarsson S (1995)**

Ultrastructure of the secretory endometrium during oestrus in young maiden and foaled mares.  
Equine Veterinary Journal 27: S. 382–388.

**Valenzuela P, Hernandez MJ, Remacha M, Nieto A, Ruiz A (1995)**

Analysis of sampling methods for cervical cytology.  
Journal of Obstetrics & Gynaecology 1: S. 53–56.

**Vidament M, Dupere AM, Julianne P, Evain A, Noue P, Palmer E (1997)**

Equine frozen semen: freezability and fertility field results.  
Theriogenology 48: S. 907–917.

**Waelchli RO, Kanzig M, Gygax A, Corboz L, Rüsch P (1993)**

The relationship between cycle stage and results of uterine culture in the mare.  
Journal of Veterinary Medicine Series A-Zentralblatt für Veterinarmedizin Reihe A-Physiology  
Pathology Clinical Medicine 40: S. 569–575.

**Waites GT, Bell SC (1982)**

Glycogen-induced intrauterine leukocytosis and its effect on mouse blastocysts.  
Journal of the Society of Reproduction and Fertility 66: S. 563–569.

**Walter J (2006)**

Untersuchungen zur zyklusabhängigen funktionellen Morphologie der equinen Zervix  
Diss. med. vet., Justus-Liebig-Universität Gießen.  
VVB Laufersweiler, 1. Aufl., Giessen.

**Walter J (2009)**

Aspekte der gynäkologischen Untersuchung. Tagungsbeitrag ATF-Fortbildung: Vorbereitung auf die Pferdezuchtsaison Gießen (24.1.2009).

**Walter J, Klein C, Wehrend A (2006)**

Usability of the Eosin-Thiazin staining method in exfoliative endometrial.  
Reproduction in Domestic Animals. 41, Suppl. 1 2006: S. 39.

**Walter J, Klein C, Wehrend A (2011)**

Comparison of eosin-thiazin and Papanicolaou-Shorr staining for endometrial cytologies of broodmares. Technical Note.  
Tierärztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/Nutztiere 39: S. 358–362.

**Walter J, Neuberg KP, Failing K, Wehrend A (2012)**

Cytological diagnosis of endometritis in the mare: Investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results.  
Animal Reproduction Science 132: S. 178–186.

**Walter J, Wehrend A (2007)**

Exfoliative endometrial cytology as a diagnostic aid in the gynaecological examination of broodmares.  
Pferdeheilkunde 23: S. 481–488.

**Watson ED (2000)**

Post-breeding endometritis in the mare.  
Animal Reproduction Science 60-61: S. 221–232.

**Watson ED, Stokes CR, Bourne FJ (1987)**

Cellular and humoral defence mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis.  
Veterinary Immunology and Immunopathology 16: S. 107–121.

**Wehrend A, Huchzermeyer S, Bostedt H (2005)**

Distribution of eosinophils and mast cells in the cervical tissue of non-gravid mares during dioestrus.  
Reproduction in Domestic Animals 40: S. 562–563.

**Williamson P, Dunning A, O'Connor J, Penhale WJ (1983)**

Immunoglobulin levels, protein concentrations and alkaline phosphatase activity in uterine flushings from mares with endometritis.

Theriogenology 19: S. 441–448.

**Wilsher S, Allen WE (2003)**

The effects of maternal age and parity on placental and fetal development in the mare.

Equine Veterinary Journal 35: S. 476–483.

**Wilson DL (1985)**

Diagnostic and therapeutic hysteroscopy for endometrial cysts in mares.

Veterinary Medicine 80: S. 59–63.

**Wingfield Digby NJ, Ricketts SW (1982)**

Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978-1981.

Journal of Reproduction and Fertility. Supplement 32: S. 181–185.

**Witherspoon DM, Goldston RT, Adsit ME (1972)**

Uterine culture and biopsy in the mare.

Journal of the American Veterinary Medical Association 161: S. 1365–1366.

## **Danksagung**

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Dr. Axel Wehrend für die Überlassung des interessanten Themas, die ständige Motivation bei der Betreuung und die stets zügig durchgeführten Korrekturen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. Klaus Failing und Frau Marion Sparenberg für ihre geduldige Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten bedanken.

Ein großer Dank gebührt meinem Vater Herrn Dr. Anton Peter Graßl. Ohne seine geduldige klinische Ausbildung und stetige Hilfestellung bei der Probensammlung und Fragen aller Art wäre ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein herzliches Dankeschön auch an meine Mutter für ihre andauernde Unterstützung während des gesamten Studiums und die geleistete Unterstützung während dieser Arbeit.

Desweiteren danke ich meiner Stiefmutter Frau Dr. Christiane Graßl für ihren Beitrag zum Gelingen dieses Werkes.

Meiner Freundin Birthe Gröne danke ich für die unermüdlichen Korrekturen, hilfreichen Ratschläge und die Motivation während des schriftlichen Teils.

Ein weiterer Dank gilt Frau Sabine Feller für die Messung meiner Hormonwerte und allen anderen Mitarbeitern der KGGA, die mich im Laufe der Arbeit unterstützt haben.

Unserem Stallmeister Herrn Hendrik Mackow danke ich für seine Geduld während der Probengewinnung.

Bei meiner Familie möchte ich mich für die Unterstützung während des Studiums und der Doktorarbeit bedanken.

Der Firma Synlab Labordienstleistungen in Augsburg danke ich für die zur Verfügung gestellte Zentrifuge.

Ebenfalls danke ich allen Freunden und weiteren Personen, die mir während dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
**STAUFENBERGRING 15**  
**D-35396 GIESSEN**

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
[redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

ISBN: 978-3-8359-6225-5



9 783835 196225 5